

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. Dr. med. Christoph Klein

**Surfactantprotein A
Oligomere bei cystischer Fibrose**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maria Kroumova Feilcke

aus
Sofia

2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Gries

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Albrecht Bergner, Priv. Doz. Dr. Dorit Nögler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2012

In Gedenken an Maria-Luisa

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
 1. Einleitung	 7
1.1. Zusammensetzung und physiologische Rolle von Surfactant	7
1.2. Struktur und Funktion der Surfactantproteine und Phospholipide	7
1.3. Funktion des Surfactant Protein A	12
1.4. Cystische Fibrose	16
1.5. Surfactant bei cystischer Fibrose und obstruktiver Bronchitis	17
1.6. Fragestellungen und Ziele der Arbeit	19
 2. Material und Methoden	 21
2.1. Material	21
2.1.1. Patienten und Kontrollgruppen	21
2.1.2. Durchführung der bronchoalveolären Lavage	26
 2.2. Methoden	 30
2.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	30
<i>Quantitative SP-A Bestimmung</i>	31
2.2.2 Säulenaффinitätssäulenchromatographie mit Fucose	35
2.2.3. 1 D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse	41
2.2.4. Gelfiltrationschromatographie mittels ÄKTA	44
2.2.5. Dot-Blot Assay	46
2.2.6 Quantitation DNA mit Sybr Green	48
2.2.7 Inkubation der nativen bronchoalveolären Lavagen mit DNase	49
2.2.8 Inkubation der nativen bronchoalveolären Lavagen mit N-Glykosidase F (NGF)	50
2.2.9 Statistische Auswertung	51
 3. Ergebnisse	 53
3.1. Klinische Parameter	53
3.2. Zytospin	53

3.3. Surfactant Protein A (SP-A) bei cystischer Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe:	56
<i>a) Surfactant Protein A (SP-A) Konzentrationen in der Bronchoalveolären Lavagen</i>	56
<i>b) SP-A Konzentrationen in der CF BAL: Bezug zum Keimnachweis</i>	57
<i>c) SP-A Konzentrationen und klinische Parameter beider Gruppen</i>	58
<i>d) SP-A Konzentrationen und BAL Zelldaten beider Gruppen</i>	61
<i>e) Korrelation zwischen den SP-A Konzentrationen und den klinischen Parametern bei Cystischer Fibrose abhängig vom mikrobiologischen Befund</i>	63
3.4. Makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) der bronchoalveolären Lavagen der CF- und Kontrollgruppe im Vergleich: <u>Versuche ohne Detergenz</u>	68
3.4.1. <i>Analyse der SP-A Struktur der nativen CF- und Kontroll-BAL mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA)</i>	68
3.4.2. <i>Affinitätschromatographie:</i>	72
<i>Analyse der SP-A Struktur von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA)</i>	73
3.5 Makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) in der CF und Kontroll BAL im Vergleich: <u>Versuche mit Detergenz</u>	76
3.5.1 Fucose-Agarose Affinitätschromatographie bei bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit cystischer Fibrose	76
<i>Makromolekulare Zusammensetzung von SP-A:</i>	
<i>Vergleich der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen</i>	81
3.5.2 Fucose-Agarose Affinitätschromatographie bei bronchoalveolären Lavagen der Kontrollgruppe	85
<i>Makromolekulare Zusammensetzung von SP-A:</i>	
<i>Vergleich der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen</i>	89

3.6 Einfluss von DNA auf die Bindungseigenschaften von SP-A in der BAL	95
3.6.1 <i>Gelfiltrationschromatographie nativer BAL nach Inkubation mit DNase</i>	95
3.6.2 <i>Invitro Inkubation mit DNase der BAL vor Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose</i>	97
3.6.3 <i>Bestimmung der DNA Konzentration der nativen BAL bei cystischer Fibrose und Kontrollen</i>	101
a) <i>Vergleich der klinischen Daten der CF Patienten bezogen auf die DNA Konzentration der BAL</i>	102
b) <i>Vergleich der BAL Daten der CF Patienten bezogen auf die DNA Konzentration der BAL</i>	104
c) <i>Korrelationen der DNA Konzentration und „SP-A non-binding“ der CF- und Kontrollgruppe</i>	105
3.7 „SP-A non-binding“ bei cystischer Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe	109
a) <i>Korrelationen der „SP-A non-binding“ und der klinischen Daten der CF- und Kontrollgruppe</i>	109
b) <i>Korrelationen der „SP-A non-binding“ und der BAL Zelldaten der CF- und Kontrollgruppe</i>	112
c) <i>Korrelationen der „SP-A non-binding“ und der SP-A Konzentrationen der BAL der CF- und Kontrollgruppe</i>	114
d) <i>„SP-A non-binding“ in Abhängigkeit von der Therapie mit rhDNase (Pulmozyme®)</i>	115
e) <i>DNA Konzentration der Lavagen in Abhängigkeit von der Therapie mit rhDNase (Pulmozyme)</i>	116
4 Diskussion	117
4.1 Patienten- und Kontrollkollektiv	118
4.2 Zytologische und bakteriologische Daten	118
4.3 Surfactan Protein A (SP-A) bei cystischer Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe	119
4.4 Makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) der bronchoalveolären Lavagen der CF- und Kontrollgruppe im Vergleich	120

4.5	Affinitätschromatographie der BAL von Patienten mit cystischer Fibrose und Kontrollen	122
4.6	Einfluss von DNA auf die Bindungseigenschaften von SP-A in der BAL	125
5	Zusammenfassung	127
6	Anhang	129
6.1	EXKURS 1: SP-A Bindungseigenschaften mittels Säulenchromatographie (Versuche mit Detergenz): Etablierung der Methode und Darstellung Mittels 1D Gelelektrophorese und Immunoblot	129
6.1.1	<i>Affinitätschromatographie mit Mannose-Agarose</i>	129
6.1.2	<i>Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose</i>	132
6.1.3	<i>Inkubation von rhSP-A und Fucose-Agarose</i>	133
6.1.4	<i>Bestimmung der minimalen Bindungskapazität der Fucose-Agarose-Säule</i>	135
6.1.5	<i>Bestimmung der maximalen Bindungskapazität der Fucose-Agarose-Säule</i>	136
6.1.6	<i>Säulenchromatographie ohne Fucose als Kontrollversuch</i>	139
6.1.7	<i>Inkubation der BAL mit N-Glucosidase F</i>	140
6.1.8	<i>Versuche mit Mannose-Säulenchromatographie und BSA</i>	143
6.2	EXKURS 2: Makromolekulare Organisation mittels Gelfiltrationschromatographie	144
6.2.1	<i>Affinitätschromatographie mit Detergenz: Analyse der SP-A Struktur von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA)</i>	144
6.2.2	<i>Gelfiltrationschromatographie nativer BAL mit Zugabe Detergenz</i>	147
6.2.3	<i>Affinitätschromatographie <u>ohne</u> Detergenz: Auswertung mittels 1 D Gelelektrophorese</i>	148
7	Literaturverzeichnis	151
8	Danksagung	157

Abkürzungsverzeichnis

ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose
°C	Grad Celsius
1D SDS Page	Eindimensionale Sodiumdocecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
BAL/BALF	Bronchoalveoläre Lavage/ Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BEAT	Bronchoalveolar Lavage for Evaluation of Early Antiinflammatory
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CRP	C-reaktives Protein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FEV1	Forced expiratory volume in the first second (Einsekundenkapazität)
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IL8	Interleukin 8
kDa	Kilodalton
LA	Large Aggregates
LDH	Laktatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
MBL	Mannan-binding Lektin
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NGF	N-Glucosidase F
OD	optische Dichte
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBS	Phosphate buffered saline
RSD	Relative Standardabweichung
SEM	Standard Error of Mean
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TBS	Tris buffered saline
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Surfactant

Pulmonales Surfactant (engl.: **surface active agent** oder oberflächenaktive Substanz) ist ein homogenes Gemisch, das aus Phospholipiden, neutralen Lipiden und Proteinen besteht (Griese 1999). Es wird von Typ II Pneumozyten gebildet und kleidet die Lungenalveolen und kleinen Atemwege als Flüssigkeitsfilm aus. In den Lungenalveolen setzt das Surfactant die Oberflächenspannung an der Luft-Flüssigkeitsgrenzschicht auf ein Minimum herab und verhindert somit den endexpiratorischen Kollaps der Alveolen. Auf diese Art und Weise wird nicht nur eine ausreichende Oxygenierung gewährleistet, es wird sondern auch gleichzeitig eine Reduzierung der Atemarbeit erreicht (Jobe 1993). Die oberflächenaktive Wirkung des Surfactant beruht vor allem auf die amphiphile Struktur der Phospholipiden.

Surfactant besteht zu 90 % aus Lipiden, wobei Phospholipide am stärksten vertreten sind, dabei macht Phosphatidylcholin, das zu 65 % in gesättigter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt, den Hauptanteil aus. Das DPPC ist vor allem für die Reduzierung der Oberflächenspannung sehr wichtig.

Darüber hinaus besteht Surfactant zu 10 % aus Proteinen. Nur etwa die Hälfte der Proteine sind spezifische Surfactantproteine, der Rest sind Plasmaproteine. Es werden zwei Typen von Surfactantproteinen unterschieden: die hydrophilen Surfactantproteine SP-A und SP-D und die hydrophoben Surfactantproteine SP-B und SP-C (Griese 1999).

Insbesondere durch die Surfactantproteine SP-A und SP-D spielt Surfactant eine wichtige Rolle bei der lokalen Immunmodulation und pulmonalen Infektabwehr (Haagsman and Diekmel 2001; Crouch and Wright 2001; Wright 1997).

1.2 Synthese, Struktur und Organisation von Surfactant Protein A

Das pulmonale Surfactant Protein A gehört zur Gruppe der C-Typ Lektine auch Kollektine genannt (Holmskov, Thiel, and Jensenius 2003). Zur Familie der Kollektine zählen auch das Surfactant Protein D, das Mannan-bindende Lektin (MBL), das bovine Conglutinin und das Collectin 43 (CL-43). Diese Moleküle hat man Kollektine genannt, da sie in ihrer Struktur

sowohl einen kollagenartigen Anteil aufweisen als auch eine Lektindomäne oder Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate recognition domain, CRD) mit der sie kalziumabhängig Kohlenhydratsequenzen erkennen und binden können (Crouch and Wright 2001; Crouch 1998). Auf diese Art und Weise können Kollektine Kohlenhydratoberflächen von Krankheitserregern erkennen und binden. Die dabei entstandenen Agglutinate werden nicht nur durch die mukoziliäre Clearance besser entfernt, sondern aktivieren auch die Phagozytose durch Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten (Madan et al. 1997). Kollektine und somit auch das Surfactant Protein A (SP-A) spielen beim angeborenen Immunsystem der Lunge eine entscheidende Rolle (Crouch 1998; Griesse 1999; Mason, Greene, and Voelker 1998).

Menschliches Surfactant Protein A (SP-A) ist ein hydrophiles Glycoprotein und wird in der Lunge von Typ-II-Pneumozyten und in den Bronchioli von Clarazellen gebildet, darüber hinaus wird SP-A auch in trachealen Drüsenzellen exprimiert (Haagsman and van Golde 1991; Chander 1989; Mason, Greene, and Voelker 1998).

SP-A wird zusammen mit den anderen Surfactantbestandteilen im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und über den Golgi-Apparat zu den Lamellenkörperchen transportiert. Diese werden durch Exozytose in den Alveolarraum sezerniert. Die Ausschüttung der Lamellenkörperchen kann durch eine Akute-Phase-Reaktion oder auch durch Hyperventilation stimuliert werden. Hemmend auf die Ausschüttung wirken z. B. Surfactantprotein A, andere Lektine und verschiedene Phospholipide (Griesse, Gobran, and Rooney 1991).

SP-A liegt im Alveolarraum nahezu vollständig als Lipid-Protein-Komplex vor (Mason, Greene, and Voelker 1998). SP-A wird zwar als Lungen-Kollektin bezeichnet, es kann aber auch in den Epithelien nahezu aller inneren Organe nachgewiesen werden (Stahlman et al. 2002).

Das Gen für SP-A ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 (10q22.2-23.1) lokalisiert. Humanes SP-A wird von zwei Genen (SFTPA1 und SFTPA2) codiert (Hoover and Floros 353-62). Beide humane SP-A Gene unterscheiden sich durch ca. 21 Nukleotide in der codierenden Region (Katyal, Singh, and Locker 1992). Die meisten anderen Spezies wie z.B. Ratte, Maus, Haase und Hund besitzen nur ein einziges Gen. SP-A wird durch verschiedene posttranslationale Vorgänge, wie proteolytische Spaltung, Acetylierung, Sulfonierung und Carboxylierung modifiziert, das erklärt auch die relativ weite Größenverteilung von 28-36 Kilodalton des SP-A Monomers (Hawgood et al. 1985; Mason, Greene, and Voelker 1998).

SP-A ist das größte Surfactantprotein. Es ist ein Oligopeptid, das aus 228 Aminosäuren besteht. Am C-terminalen Ende befindet sich die Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate recognition domain, CRD), gefolgt von einer kurzen Verbindungsdomäne (neck region), einer langen collagenähnlichen Region (collagenous-domain) und schließlich einer kurzen N-terminalen, glycinreichen Disulfid-Domäne (Aminoterminal). Drei solche Polypeptidketten – auch Monomere genannt – können über Disulfidbrücken in der neck Domäne sich zu einer Trippelhelix anlagern, dabei entsteht ein so genanntes Trimer. Sechs dieser trimeren Strukturen lagern sich zu einem Oktadecamer (auch Hexamer genannt) zusammen, das durch einen Knick in der Kollagendomäne die typische blumenstraußähnliche Struktur ausbildet (Siehe Abbildung 1). Diese Formation wird aufgrund der Ähnlichkeit oft auch als „Tulpenstrauß“ bezeichnet. (Kishore et al. 2006). Humanes SP-A akkumuliert in vivo vorwiegend zum Octadecamer (18-mer).

Natives humanes SP-A kann aus Homotrimeren aber auch aus Heterotrimeren zusammengesetzt sein aufgrund der zwei genetisch unterschiedlichen Polypeptidketten SP-A1 und SP-A2 (Voss et al. 1991). Man geht davon aus, dass ein Heterotrimer aus zwei SP-A1 Polypeptidketten und einer SP-A2 Polypeptidkette gebildet wird. Die relativen Verhältnisse zwischen Homo- und Heterotrimeren im nativen humanen SP-A sind noch nicht endgültig festgelegt. Genauso wenig ist darüber bekannt, ob beide SP-A Formen von einer oder von zwei unterschiedlichen Zelltypen produziert werden.

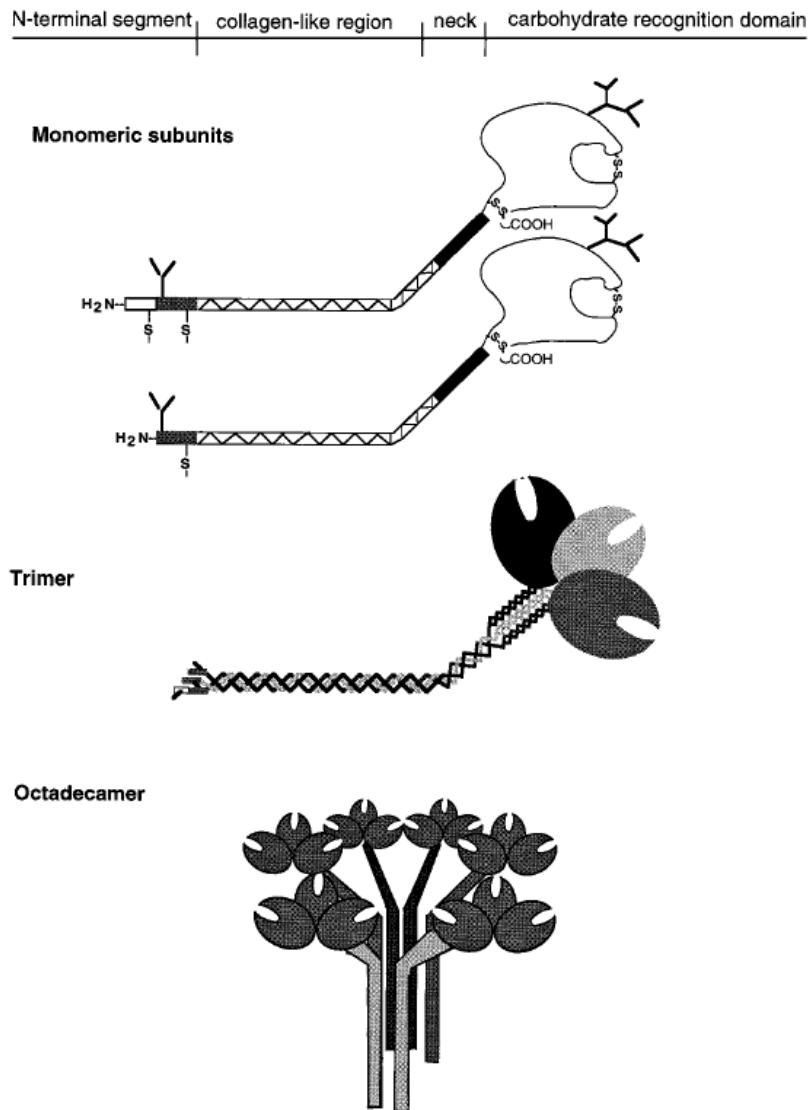


Abb. 1.: Pulmonales Surfactant Protein A und Oligomerisation

Darstellung der primären Struktur von SP-A mit ihren vier Untereinheiten: eine kurze N-terminale Domäne, eine kollagenähnliche Region, eine kurze Neck-Domäne und eine Kohlenhydratbindungsdomäne (CRD). Drei Polypeptidketten bzw. Monomere lagern sich zu einem Trimer an. Sechs trimere Untereinheiten bilden das Octadecamer, das über Disulfidbrücken zwischen den einzelnen N-terminalen Domänen stabilisiert wird. (McCormack 1998)

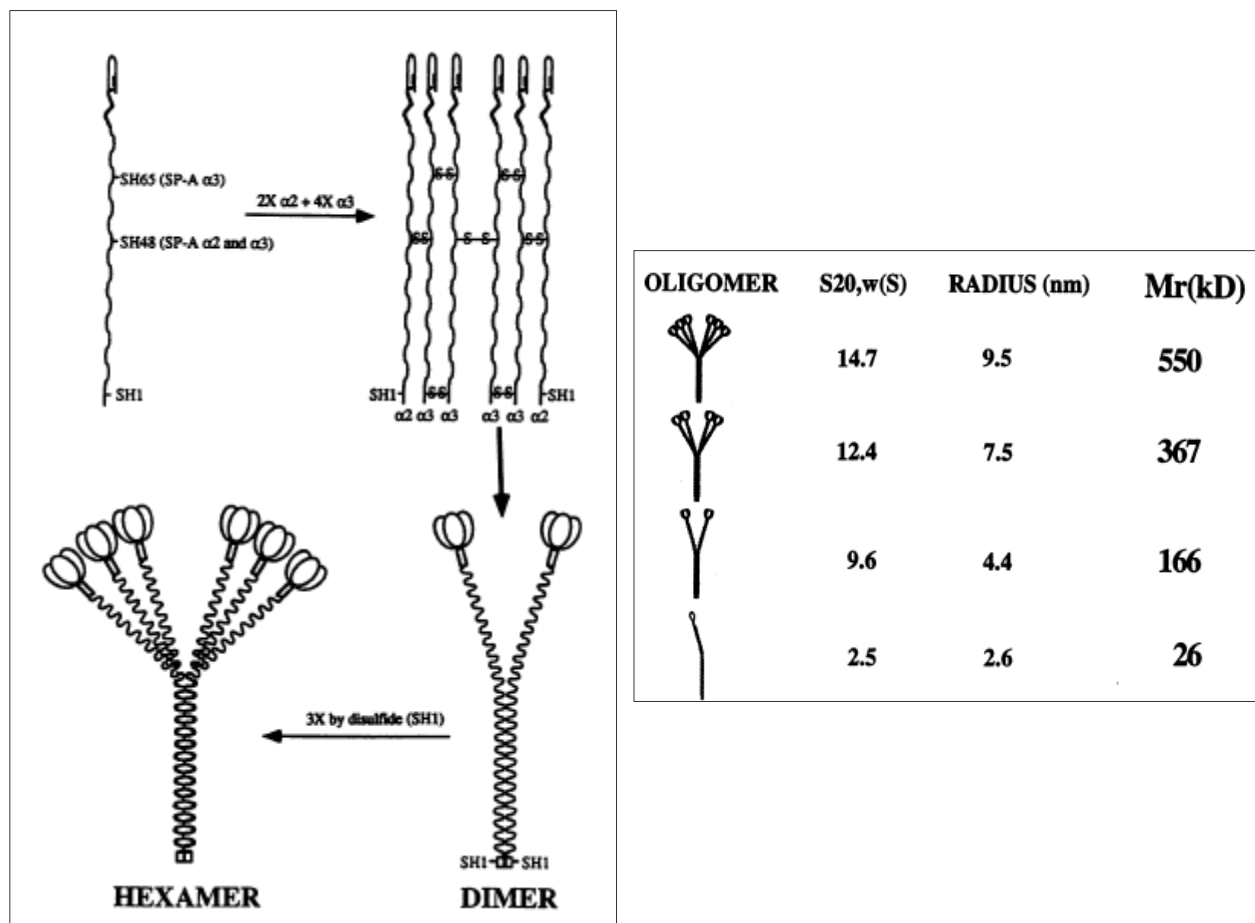


Abb. 2: Darstellung der Oligomerisation über Disulfidbrücken (links) und der Molekulargröße (Kilodalton) der einzelnen SP-A Oligomeren (rechts) (Hickling, Malhotra, and Sim 266-75).

Eine einzelne CRD-Region besitzt eine sehr geringe Bindungsaffinität für Kohlenhydratsequenzen, das konnte bereits für MBL gezeigt werden (Weis and Drickamer 1996). Aus diesem Grund kommt es in vivo zur Ausbildung von SP-A Trimeren. Erst durch die Entstehung von trimeren Strukturen können multivalente Interaktionen mit Kohlenhydratsequenzen entstehen und Oligosaccharidkomplexe, so wie sie typischerweise auf Pathogenoberflächen bestehen, können kalziumabhängig erkannt und mit hoher Affinität gebunden werden. Allerdings kann erst durch die Bildung von höher organisierten Multimeren von SP-A (bis hin zu einem 18-mer oder Octadecamer) eine sehr hohe Bindungsaffinität zu pathogenen Oberflächenstrukturen entstehen. Demzufolge wurden bei der Isolierung von nativem

SP-A vorwiegend Octadecamere gefunden. (Hickling, Malhotra, and Sim 1998; Weis and Drickamer 1996)

1.3 Funktion des Surfactant Protein A

Humanes Surfactant Protein A ist an der Regulation des Surfactantstoffwechsels beteiligt (Jobe 861-68). Hierbei sorgt es dafür, dass die Inaktivierung von Surfactant verhindert wird und es zu einer verstärkten Wiederaufnahme und Wiederverwendung von Phospholipiden in den Typ II-Pneumozyten kommt (Mason, Greene, and Voelker 1998). SP-A beschleunigt die Ausrichtung der Phospholipide an der Luft-Wasser-Grenze in den Alveolen und reduziert hier die Oberflächenspannung.

Darüber hinaus belegen in vivo und in vitro Studien, dass das hydrophile Surfactantprotein A eine entscheidende Rolle bei der angeborenen, unspezifischen Immunabwehr der Lunge spielt (Holmskov, Thiel, and Jensenius 2003; Kishore et al. 2006; Wright 2005).

Humanes SP-A erkennt über seine Kohlenhydratbindungsdomäne (CRD) Kohlenhydratsequenzen auf Oberflächen von pathogenen Organismen und bindet spezifisch an eine Vielzahl von monosacchariden Liganden wie Mannose, Glucose, Galactose und L-Fucose (Haagsman et al. 1987). Die Bindung der verschiedenen löslichen aber auch membran-assoziierten Liganden erfolgt kalziumabhängig.

Folglich können SP-A Moleküle eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze, aber auch Lipopolysaccharide (LPS, Endotoxin) und Allergene binden (Haagsman 1998).

Die Bindung des SP-A an die Krankheitserreger führt in einigen Fällen zu deren Agglutination, wodurch die Mikroorganismen über die mukoziliäre Clearance leichter entfernt werden können. SP-A kann über spezifische Bindungsstellen mit Makrophagen interagieren. Die Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen kann dadurch gesteigert werden und somit kann die anschließende Abtötung der Mikroorganismen erfolgen. Insgesamt sind SP-A Proteine an der Modulation der Immunantwort beteiligt. (Haagsman et al. 2008). Zwar kann SP-A sowohl an gram-positive wie auch an gram-negative Bakterien, Pilzen wie *Aspergillus fumigatus* und *Candida albicans* und Viren binden, die Aktivierung und Verstärkung der Phagozytose findet aber nicht jedes Mal zwingend statt. Dies hängt von verschiedenen Faktoren ab wie z.B. Bakterienstamm, LPS-Typ und bakterielle Wachstumsphase.

In Tabelle 1 sind Bakterien, Pilze und Viren aufgelistet, mit denen SP-A interagieren kann.

SP-A kann die Phagozytose von *Pseudomonas aeruginosa* verstärken (Bufler et al. 2003).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SP-A eine Vielzahl von Allergenen wie z.B. Pollen, Hausstaubmilben und *Aspergillus fumigatus* binden kann (Malhotra et al. 1993; Wang et al. 1996). SP-A bindet Pollenproteine und Hausstaubmilbenallergene kalziumabhängig und verhindert dadurch die Bindung von spezifischem Immunglobulin E (IgE) an diese Inhalationsallergene, folglich wird eine allergische Reaktion in der Lunge abgeschwächt bzw. verhindert (Wang et al. 1996).

Durch die intranasale Applikation von SP-A bei Mäusen in einem Modell mit Allergischen-bronchopulmonalen Aspergillosis oder Hausstaubmilbenallergie konnte die Anzahl der Eosinophilen und der spezifischen Antikörper deutlich reduziert werden (Madan et al. 2001).

Darüber hinaus kann SP-A durch Bindung an Makrophagen deren Chemotaxis verstärken. Neben der Beeinflussung der Phagozytose und Chemotaxis ist für SP-A auch eine Verstärkung des respiratory burst der Makrophagen nachgewiesen: durch die Bildung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen kann die Elimination von Mikroorganismen unterstützt werden (Blau et al. 1997).

Die von den T-Zellen ausgehende Immunantwort kann durch SP-A so moduliert, dass Überreaktion des Immunsystems verhindert werden kann. Erreicht wird dies durch eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen und eine Proliferationshemmung der T-Zellen (Borron et al. 1998).

Spezies	Bindung	Agglutination	Anlagerung	Aufnahme	Abtötung
Pilze					
Aspergillus fumigatus	✓	✓	✓	✓	✓
Pneumocystis carinii	✓		✓		
Cryptococcus neoformans	✓				
Candida albicans	✓				
Histoplasma capsulatum	✓				
Gram-negative Bakterien					
Escherechia coli	✓	✓	✓	✓	✓
Haemophilus influenzae	✓	✓	✓	✓	✓
Klebsiella pneumoniae	✓	✓			✓
Pseudomonas aeruginosa			✓	✓	
Helicobacter pylori	✓				
Chlamydia trachomatis	✓				
Chlamydia pneumoniae	✓				
Gram-positive Bakterien					
Staphylococcus aureus	✓	✓	✓	✓	✓
Streptococcus pneumoniae	✓		✓	✓	
Gruppe B Streptococcus	✓		✓	✓	
Mykobakterien					
Mycobacterium tuberculosis	✓		✓	✓	
Mycobacterium avium	✓		✓	✓	
Mycobacterium bovis BCG	✓		✓	✓	
Mykoplasmen					
Mycoplasma pneumoniae	✓				✓
Mycoplasma pulmonis	✓				✓
Viren					
Herpes simplex virus	✓			✓	
Respiratory syncytial virus	✓				
Influenza A virus	✓			✓	
Allergene					
Pollen	✓				
Hausstaubmilben	✓				

Tab. 1.: Interaktion von Surfactant Protein A mit Pathogenen und Allergenen

Dargestellt ist die Bindung und die Art der vermittelten Immunantwort durch SP-A: Agglutination des Mikroorganismus, Anlagerung (SP-A bindet über die Membran von phagozytierenden Zellen den Erreger über seine CRD Region), Aufnahme des Mikroorganismus über eine phagozytierende Zelle und anschließend Abtötung.

Eine Vielzahl an spezifischen Rezeptoren für SP-A wurde identifiziert wie z.B. SPR-210, GP-340, SIRP-alpha, Toll Like Receptors (TLRs), Rezeptoren für C1q, der CD91 Komplex und Calreticulin (Kishore et al. 2006). Vermutlich kann SP-A mit vielen unterschiedlichen Immunzellen interagieren und dabei sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Reaktionen auslösen. Die Möglichkeit von SP-A proinflammatorisch zu wirken, hängt davon ab, ob SP-A über seine CRD Region an einem Pathogen bzw. an der apoptotischen Zelle gebunden ist (Gardai et al. 2003). In diesem Fall interagiert die unbesetzte Collagen-Domäne von SP-A mit CD91/Calreticulin und kann dadurch NFκ-B aktivieren, folglich wird die inflammatorische Signalkaskade in Gang gesetzt. Demgegenüber ist in der nicht-infizierten Lunge die CRD Region frei und kann dadurch an SIRP-alpha der Zelle binden. Dadurch wird die inflammatorische Signalkaskade der Zelle über die SHP-1 vermittelten Hemmung von P38 unterdrückt (siehe auch Abbildung 2) (Wright 2006).

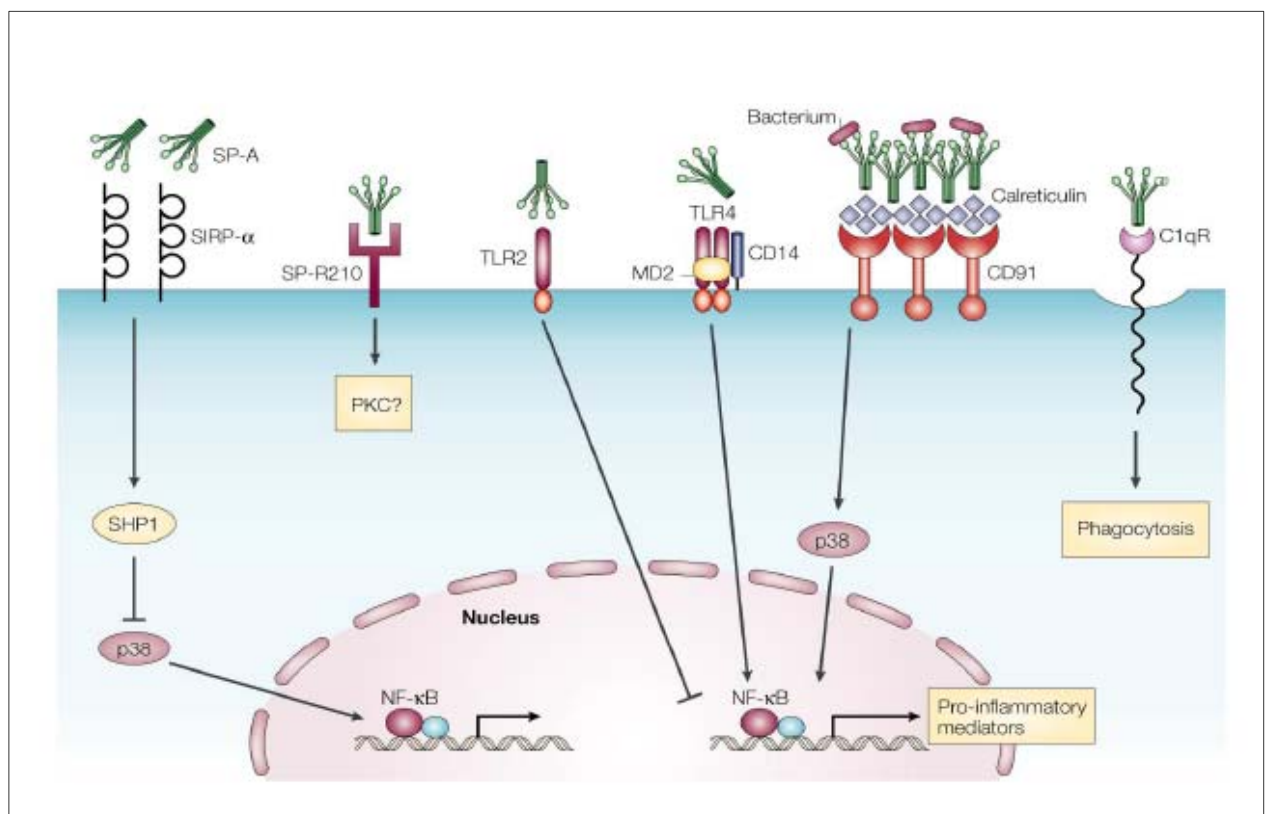


Abb. 3.: SP-A bindet an eine Vielzahl von potentiellen Oberflächenrezeptoren. Die Bindung an spezifische Zell-Rezeptoren führt zur Aktivierung oder Hemmung unterschiedlicher Signalwege innerhalb der Zelle (Wright 2006).

Bei Studien mit Knockout-Mäusen, denen SP-A fehlte, zeigte sich, dass diese sehr anfällig für vorwiegend bakterielle Infektionen waren. Ihre Atemfunktion und die Surfactanthomöostase waren dagegen kaum beeinträchtigt (LeVine et al. 1997).

1.4 Cystische Fibrose

Die Mukoviszidose (cystische Fibrose, CF) wird autosomal rezessiv vererbt und ist mit einer Inzidenz von ca. 1 auf 2500 Geburten weltweit eine der häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen der weißen Bevölkerung. Sie wird verursacht durch einen Gendefekt auf dem langen Arm des Chromosoms 7. Dieser führt zu einer veränderten oder, je nach Mutationstyp, sogar fehlenden Expression des sog. CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Proteins, das als Chloridkanal in epithelialen Zellmembranen fungiert. Es sind bereits weltweit über 1000 Mutationen beschrieben worden. Die in Mittel- und Nordeuropa am häufigsten vorkommende Mutation entsteht durch eine Deletion von Phenylalanin an Position 508 des Proteins (delF508). Sie tritt in ca. 70-75 % der Fälle auf. Die Folge dieser Mutation ist eine pathologische hochvisköse Sekretion aller exokrinen Drüsen mit konsekutiver Sekretretention und nachfolgender chronischer Entzündung. Die davon betroffenen Organe sind unter anderem die Bauchspeicheldrüse, der Gastrointestinaltrakt, das hepatobiliäre System aber vor allem die Atmungsorgane (Donaldson and Boucher 2003; Gibson, Burns, and Ramsey 2003).

Die Atemwegsbeteiligung ist vorwiegend für die Morbidität und Mortalität bei cystischer Fibrose verantwortlich. Bei Neugeborenen mit CF sind die Lungen zunächst entzündungsfrei und auch keimfrei. Die pathologische Atemwegssekretion führt dort bald nach der Geburt zu rezidivierenden bakteriellen Infektionen. Zunächst reagiert die Lunge auf die akuten Infektionen mit einer überschießenden und verlängerten Entzündungsreaktion. Aufgrund der Schleimretention persistiert die Entzündungsreaktion. Im Verlauf entsteht in den Bronchien durch die ständige Auseinandersetzung des Immunsystems mit unterschiedlichen Mikroorganismen eine von neutrophilen Granulozyten beherrschte chronische Inflammation. In der Lunge kommt es durch das visköse Sekret zu chronischen bakteriellen Besiedlungen, häufig durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Bei Fortschreiten der Erkrankung finden auch Veränderungen in der Lunge und unteren Atemwegen wie z.B. Emphyseme, Atelektasen, Bronchiektasen und Abszesse. Zystenbildung und Fibrosierungen des Lungparenchyms sind die Folge. Der Verlauf der Lungenerkrankung weist bei Patienten mit gleichem

Genotyp eine große Variabilität auf. Viele der hier zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht bekannt.

1.5 Surfactant bei Cystischer Fibrose und obstruktiver Bronchitis

Bei vielen Lungenerkrankungen ist bekannt, dass sie mit charakterischen Veränderungen in der Zusammensetzung der im Surfactant enthaltenen Phospholipiden und Proteinen einhergehen. Diese Veränderungen können nicht nur den Gehalt an Surfactantproteinen sondern auch deren Funktion betreffen.

Untersuchungen des pulmonalen Surfactant werden meist im Lungensekret, das durch eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen wird, durchgeführt.

Bei Patienten mit Cystischer Fibrose kommt es aufgrund der bakteriellen Besiedlung der Atemwege mit vorwiegend *Pseudomonas aeruginosa* zu einer chronischen endobronchialen Infektion. Demzufolge enthält das Sekret der unteren Atemwege einen hohen Anteil an neutrophilen Granulozyten. Sogar bei CF Patienten mit einem stabilen klinischen Verlauf und einer mild ausgeprägten Lungenbeteiligung konnten in den bronchoalveolären Lavagen (BAL) ein hoher Anteil an neutrophilen Granulozyten und auch hohe Konzentration an neutrophilen Elastasen gefunden werden (Konstan et al. 1994). Selbst bei Neugeborenen und bei sehr jungen Kindern mit Cystischer Fibrose, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keinen klinischen Nachweis für eine akute Atemwegsinfektion hatten, konnte bereits eine Inflammation der unteren Atemwege nachgewiesen werden (Armstrong et al. 1997; Armstrong et al. 2005).

Durch die chronische Inflammation der CF Lunge können signifikante qualitative und quantitative Veränderungen nicht nur der Surfactant Phospholipide sondern auch der Surfactant Proteine stattfinden. Studien in vitro haben gezeigt, dass Neutrophile Lipasen, Proteasen und Oxidantien biochemische Veränderungen des Surfactant hervorrufen können (Holm et al. 1991; Konstan et al. 1994; Haddad et al. 1994; Ryan, Ghassibi, and Liao 1991).

Zusammengefasst verursacht die chronische neutrophile Inflammation in der CF Lunge eine proteolytische Degradation von Surfactant Protein A (Griese et al. 2001), die dann möglicherweise die Funktion von SP-A vermindern kann.

Wie bereits geschildert liegt Surfactant Protein A (SP-A) unter nativen Bedingungen wahrscheinlich vorwiegend als höherorganisiertes Multimer: Hexamer bzw. Octadecamer vor. Das Octadecamer stellt die immunologisch gesehen aktivste Form von SP-A dar. Surfactant Protein A existiert in vivo nicht nur aus Octadecameren sondern auch aus kleineren oligomeren Formen: Tetramere, Dimere und Polypeptide. Das Verhältnis der Polymere variiert von Probe zu Probe, unterscheidet sich wahrscheinlich bei unterschiedlichen Lungenerkrankungen. Das unterschiedliche Verhältnis der SP-A Multimere kann sich aber sehr wahrscheinlich auch auf die Erkrankungen auswirken (Hickling, Malhotra, and Sim 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass isoliertes SP-A unter Oxidation seine Fähigkeit, Pollen zu binden, verliert. Durch die Oxidation werden Disulfidbrücken gespalten und dadurch kommt es zur Depolymerisation des Proteins. Folglich wird die quartäre Struktur des SP-A Proteins zerstört und gleichzeitig seine Bindungsaktivität an Kohlenhydratstrukturen wie z.B. Pollen reduziert (Stuart, Sim, and Malhotra 1996).

Bei jungen Kindern mit Cystischer Fibrose konnten erhöhte SP-A Konzentrationen gemessen werden (Hull et al. 1997). Während ältere CF-Patienten verminderte Konzentrationen des Surfactant Proteina A aufwiesen (Griese, Birrer, and Demirsoy 1983-8; Meyer et al. 1997).

Bei Messungen von SP-A Konzentrationen aus bronchoalveolären Lavagen (BAL) wurden negative Korrelationen mit dem Ausmaß der Entzündungsaktivität zum Zeitpunkt der BAL beobachtet (Noah et al. 2003). Folglich waren die SP-A Level der CF Lavage nur dann signifikant niedriger im Vergleich zu nicht-CF Lavagen wenn eine bakterielle Inflammation in der CF Lavage nachgewiesen werden konnte.

Bei Kindern mit bakteriellen Pneumonien zeigten sich neben einer Verminderung der Phosphatidylcholin in der bronchoalveolären Lavage auch eine deutliche Verminderung der SP-A Konzentration (Gunther et al. 1996; Noah et al. 2003). Für Patienten mit Bronchitis wurden ähnliche Veränderungen in der BAL wie bei Pneumonie aber auch wie bei Patienten mit Cystischer Fibrose beschrieben. Bei Kindern mit akuter viraler Bronchiolitis konnten in der BAL auch deutlich niedrigere Konzentrationen an SP-A im Vergleich zu BAL von gesunden Kontrollen gemessen werden (Dargaville, South, and McDougall 1996).

Bei Patienten mit einem milden Asthma bronchiale konnten erhöhte SP-A Level der Lavagen im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden (Cheng et al, 2000).

1.6 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Struktur d.h. die makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) bei Patienten mit cystischer Fibrose zu untersuchen. Vom besonderen Interesse war es, die Funktion von SP-A d.h. die Kohlenhydratbindungsfähigkeit dieses Proteins zu untersuchen und mit anderen Lungenerkrankungen zu vergleichen. Hierzu wurden Patienten mit chronisch rezidivierenden Bronchitiden und Asthma bronchiale ausgewählt. Die CF Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung in einem stabilen klinischen Zustand: sie hatten keine pulmonale Exazerbation, keine chronische Infektion der Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa* und sie hatten eine stabile Lungenfunktion.

Wir stellten die Hypothese auf, dass die Funktion von Surfactant Protein A (SP-A) selbst in der Lunge von klinisch stabilen Patienten mit cystischer Fibrose vermindert ist.

Hierzu interessierte uns, ob die Funktion von Surfactant Protein A bei Patienten mit rezidivierenden Bronchitiden bzw. Asthma bronchiale vergleichbar ist.

Dazu wurde SP-A aus Bronchoalveolären Lavalgen von CF Patienten und Patienten mit rezidivierenden Bronchitiden untersucht und miteinander verglichen.

Die Struktur und Funktion von SP-A wurde in Zusammenhang mit den klinischen Daten beider Patienten verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten- und Kontrollgruppen

Das Patientenkollektiv bestand aus 28 Patienten mit cystischer Fibrose (CF). Die Proben wurden im Rahmen der BEAT-Studie (Bronchoalveolar Lavage for Evaluation of Early Antiinflammatory Treatment) mittels bronchoalveolärer Lavage gewonnen. Die Patienten waren im Alter von 6,3 bis 17,3 Jahren (Median 11,7). Die Diagnose cystische Fibrose wurde durch wiederholte Schweißtests mit Chloridkonzentrationen über 60 mmol/l und/oder durch Nachweis spezifischer Mutationen im CFTR-Gen bei jedem einzelnen Patienten gesichert.

Zum Zeitpunkt der bronchoalveolären Lavage waren die Patienten in einem klinisch stabilen Zustand, sie hatten keine ausgeprägten pulmonalen oder körperlichen Einschränkungen. Es lagen keine schweren Organmanifestationen der cystischen Fibrose wie z.B. Leberzirrhose oder ein CF-assoziiertes Diabetes mellitus vor.

Die Lungenfunktion zeigte zum Zeitpunkt der BAL keine signifikanten Veränderungen der Einsekundenkapazität der Lungenfunktion (FEV_1) im Vergleich zur Lungenfunktion 4 Wochen vor der Untersuchung. Bei den meisten Patienten lag der FEV_1 Wert $> 80 \%$ des Sollwertes. Die CF Patienten hatten weder sechs Wochen vor der BAL noch zum Zeitpunkt der BAL eine akute Atemwegsinfektion oder pulmonale Exazerbation. Weiterhin hatten die Patienten keine antiinflammatorische Behandlung mit z.B. Ibuprofen, inhalativen oder systemischen Kortikosteroiden oder α_1 -Antitrypsin. Des Weiteren hatten die CF Patienten keinen Hinweis für eine allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA).

15 der vorliegenden Patienten hatten bereits zum Zeitpunkt der Lavage die inhalative Therapie mit rhDNase (Pulmozyme®), die restlichen 13 CF-Patienten erhielten keine Therapie mit Pulmozymen.

<i>Patient</i>	<i>Pat.Nr.</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter bei BAL (Jahre)</i>	<i>CFTR</i>	<i>Pulmozyme® Therapie</i>
CF-1	103-2	m	9,9	KM19-2XV2-1/ XV2c-1	nein
CF-2	105-2	w	17,3	dF508/ dF508	nein
CF-3	106-2	w	10,5	dF508/-	ja
CF-4	107-2	w	11,3	-	nein
CF-5	110-2	m	16,9	dF508/-	nein
CF-6	121-1	m	15,3	fehlt	ja
CF-7	124-2	m	14,5	dF508/ dF 508	nein
CF-8	126-2	m	12,3	dF508/ dF508	nein
CF-9	201-3	w	16,5	dF508/ dF508	nein
CF-10	204-2	m	11,1	-	ja
CF-11	205-2	m	10,1	dF508/ dF 508	ja
CF-12	206-2	w	14,8	dF508/ dF 508	ja
CF-13	211-1	m	1,8	dF508/ dF 508	nein
CF-14	212-1	m	16,8	-	nein
CF-15	213-1	w	10,3	dF508/ dF 508	nein
CF-16	215-2	m	14,8	-	ja
CF-17	216-2	m	10,4	dF508/ dF 508	nein
CF-18	217-1	w	11,1	dF508/ dF 508	ja
CF-19	221-2	m	12,8	dF508/ dF 508	ja
CF-20	222-2	w	15,4	dF508/ dF 508	ja
CF-21	223-1	m	1,0	-	ja
CF-22	224-2	m	12,1	-	ja
CF-23	225-1	w	6,3	dF508/ dF 508	ja
CF-24	413-1	m	8,3	dF508/ dF 508	ja
CF-25	418-1	m	8,3	dF508/ dF 508	nein
CF-26	504-1	m	8,2	dF508/ dF 508	ja
CF-27	406-3	w	14,9	dF508/ dF 508	ja
CF-28	503-1	w	18,8	dF508/ dF 508	nein

Tab. 2.1: Liste der Patienten mit cystischer Fibrose (CF-1 bis CF-28)
 Abkürzungen: CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator protein)
 w (weiblich), m (männlich)

<i>Patient</i>	<i>Pat.Nr</i>	<i>Größe [cm]</i>	<i>Gewicht [kg]</i>	<i>BMI [kg/m²]</i>	<i>FEV 1 [%-soll]</i>	<i>Bakteriologie Rachen</i>	<i>Bakteriologie Sputum</i>
CF-1	103-2	147	35,5	16,4	62,1	0	0
CF-2	105-2	154	54,9	23,2	77,6	2	2
CF-3	106-2	150	41,3	18,4	79,6	0	0
CF-4	107-2	137	33,5	17,9	114,4	0	0
CF-5	110-2	180	70	21,6	112,8	2	0
CF-6	121-1	174	55	18,2	83,6	1,2	1,2
CF-7	124-2	150	38,7	17,2	86,4	0	0
CF-8	126-2	164	55	20,4	120,3	2	2
CF-9	201-3	152	43,9	19,0	120	2	0
CF-10	204-2	137	29	15,5	81,2	1	0
CF-11	205-2	135	26,9	14,8	80	0	0
CF-12	206-2	156,5	51	19,0	86,1	0	0
CF-13	211-1	124	21	13,7	52	2	2
CF-14	212-1	175,8	63	20,4	102	1,2	1,2
CF-15	213-1	150	37	15,9	83,3	1,2	1,2
CF-16	215-2	157	38,8	15,7	107,4	0	0
CF-17	216-2	143,1	35,3	17,2	97	0	0
CF-18	217-1	168,1	59	18,4	103,2	0	0
CF-19	221-2	161	55,1	21,3	99,3	0	0
CF-20	222-2	157	59,7	19,0	72,6	0	2
CF-21	223-1	189	72	20,2	95,4	0	2
CF-22	224-2	147	35	16,2	96,4	0	0
CF-23	225-1	112	19,5	15,6	76,1	0	0
CF-24	413-1	128	24	14,7	103	0	0
CF-25	418-1	129	25	15,0	74,6	1	0
CF-26	504-1	155,3	37,5	15,6	97,3	2	2
CF-27	406-3	142	35,7	17,7	73,4	0	2
CF-28	503-1	176,5	61,5	19,63	79,3	2	2

Tab. 2.2: Klinische Daten der CF- Patienten

Abkürzungen: BMI (body mass index)

Bakteriologie: 0: kein Wachstum 1: Pseudomonas 2: Staph. au.

<i>Patient</i>	<i>Zellen /µl BAL Pool</i>	<i>Makro- phagen [%]</i>	<i>Lympho- zyten [%]</i>	<i>Neutrophile Granulo- zyten [%]</i>	<i>Eosino- phile [%]</i>	<i>Baso- phile [%]</i>	<i>Bakt.</i>	<i>Vita- lität [%]</i>	<i>Reco- Very [%]</i>	<i>Elasta- se [U/ml]</i>
CF-1	94600	66	3,5	29,8	0,2	0	2	78	66	232
CF-2	237850	11,5	2,5	84,6	0	0	1,2	98	89	19
CF-3	5860	86	9,4	2	0	0	2	85	90	10
CF-4	5650	88	8,6	2,8	0	0	0	83	66	534
CF-5	32400	93,2	6,3	0,5	0	0	0	82	73	10
CF-6	330	66,8	3,5	28,6	1,1	0	1	84	89	104
CF-7	9900	53	1,4	45,6	0	0	2	64	72	37
CF-8	23600	57	9	33,8	0	0	2	91	100	10
CF-9	60	53	17	29	0	0	0	83	-	36
CF-10	4000	46	15	38	0,6	0	0	92	89	10
CF-11	16180	72	6	17	1,2	0	0	91	92	84
CF-12	28000	7	0,5	90	0,6	0	2	84	95	10
CF-13	3000	92	5	2,8	0	0	2	87	58	10
CF-14	62000	52	6	42	0	0	2	84	-	10
CF-15	15000	64	7	28	1	0	0	87	90	10
CF-16	2100	68	10	22	0,3	0	0	71	-	63
CF-17	21050	25	0	55	0,2	0	0		-	113
CF-18	68000	68	71	8	21	0	0	75	65	10
CF-19	26000	79	6	21	0	0	0	74	100	10
CF-20	5000	2,7	1,2	96	0	0	0		-	100
CF-21	1000	41	7	52	0	0	0	68	90	10
CF-22	11000	73	1,6	11	0,3	0	2	86	87	372
CF-23	6000	43	17	40	0	0	2	84	89	10
CF-24	160	80,1	6,3	13,6	0	0	0	60	-	13
CF-25	560	36,2	2,3	61,5	0	0	2	32	47	10
CF-26	50	91	2	7	0	0	2		-	-
CF-27	9600	5,4	5,6	78,6	0,4	0	0	8	-	21
CF-28	19000	2	0	98	0	0	2	70	54	-

Tab. 2.3: BAL-Zytologie und Bakteriologie der CF-Patienten.

Die Werte beziehen sich auf den Pool der BAL, Zytospin in % Angaben, Elastase in U/ml.

Bakteriologie: 0: kein Wachstum 1: Pseudomonas 2: Staph. au.

Das Kontrollkollektiv bestand aus 13 Kindern, 10 der Kinder litten an einer rezidivierenden Bronchitis und 4 an einem Asthma bronchiale und hatten ebenfalls rezidivierende Bronchitiden. Die Kinder waren zum Zeitpunkt der BAL zwischen 2,4 und 17 Jahren alt (Median 7,5). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten klinisch stabil und bei Ihnen konnte keine bronchoalveoläre neutrophile Inflammation nachgewiesen werden.

<i>Patient</i>	<i>Kategorie</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter bei BAL (Jahre)</i>	<i>Größe [cm]</i>	<i>Gewicht [kg]</i>	<i>BMI [kg/m²]</i>	<i>FEV 1 [%-soll]</i>
DC-1	Asthma	m	7,1	130	35	20,7	102
DC -2	Chronische Bronchitis	w	3,1	103	20	18,9	-
DC -3	Asthma	w	6,2	117	19,2	14	-
DC -4	Bronchitis	w	11,3	160	54	21	53,4
DC -5	Asthma	w	3,2	138	49,5	25	
DC -6	Chronische Bronchitis	w	17	160	51	19,9	59,2
DC -7	Asthma	m	10,3	138	50	26,3	87
DC -8	Chronische Bronchitis	w	11,2	164,5	62	22,8	100
DC -9	Chronische Bronchitis	m	2,4	92	14,6	17,3	-
DC -10	Bronchitis	m	3,4	-	-	-	-
DC -11	Bronchitis	m	8,2	118	21	15,1	119,8
DC -12	Chronische Bronchitis	w	5,4	109	17,6	14,8	68
DC -13	Bronchitis	w	9,1	142	32	15,9	100
DC -14	Chronische Bronchitis	m	9,3	145	31	14,7	100

Tab. 2.4: **Klinische Daten der Kontrollgruppe (DC = Disease Control)**

<i>Patient</i>	<i>Zellen /µl BAL Pool</i>	<i>Makro- phagen [%]</i>	<i>Lympho- zyten [%]</i>	<i>Neutro- phile [%]</i>	<i>Eosino- phile [%]</i>	<i>Baso- phile [%]</i>	<i>Vita- lität [%]</i>	<i>Reco- very [%]</i>
DC-1	85	65	29	3	3	0	79	
DC -2	235	87	9	3	0,5	0,5	87	65
DC -3	150	82	16	2	0	0	50	-
DC -4	220	94,5	4,5	1	0	0	87	-
DC -5	255	94,5	3	2,5	0	0	90	90
DC -6								
DC -7	75	75	20	5	0	0	50	87
DC -8	20	88	12	0	0	0	66	100
DC -9	155	64,7	32	3	0,1	0	93,6	68
DC -10	280	74,8	21,6	2,4	0,4	0,4	93	54
DC -11	70	75	23,4	1	0	0	100	75
DC -12	367,5	69	23	6	1	0	96	89
DC -13	495	62	28	9	0	0	92	67
DC -14	50	85	12	2	1	0	82	-

Tab. 2.5: BAL-Zytologie der Kontrollgruppe (DC = Disease Control).
Die Werte beziehen sich auf den Pool der BAL, Zytospin in % Angaben.

2.1.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Die Bronchoskopie wurde in Anästhesie (Midazolam 0,2 bis 0,3 mg/kg Körpergewicht) mittels eines flexiblen Bronchoskops mit einem Durchmesser von 3,5 mm bei Patienten < 10 Jahre bzw. 4,9 mm bei Patienten > 10 Jahre durchgeführt. Das Bronchoskop wurde entweder in ein Subsegment des Mittellappens, der Lingula oder in die betroffene Region der entsprechenden Lungenhälfte lumenverschießend („Wedge Position“) eingeführt. Anschließend wurde die bronchoalveoläre Lavage mit auf 37° C vorgewärmter steriler 0,9 % NaCl-Lösung durchgeführt, welche instilliert und sofort wieder abgesaugt wurde. Das Volumen hierfür betrug 4-mal 1 ml/kg Körpergewicht (maximal 50 ml), wobei das Volumen der ersten Spülung (1.Fraktion) getrennt von den weiteren 3 Spülungen (gepoolte-2.-4.Fraktion) aufbereitet und untersucht wurde.

Bei Patienten der lungengesunden Kontrollgruppe erfolgte die Lavage unmittelbar nach Intubation über einen durch den liegenden Tubus eingeführten Absaugkatheter mit Endloch.

Die erste Fraktion und die Pool-Fraktion wurden separat über sterilisierte Gaze-Filter gereinigt, um gröbere Verunreinigungen zu beseitigen, bevor jeweils ein Aliquot zur mikrobiologischen und virologischen Untersuchung entnommen wurde. Gesamtzellzahlen und Differentialzellbild wurden anschließend im Zytospin nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung untersucht, wobei die erste Fraktion im Allgemeinen den überwiegenden Teil der abgeschilferten Epithelzellen und die Pool-Fraktion einen relativ höheren Anteil an Makrophagen enthält.

Für die folgenden Untersuchungen der Surfactantparameter wurde ausschließlich der nach Zentrifugation zur Zellgewinnung verbleibende Überstand der jeweiligen Pool-Fraktion verwendet.

Die Verwendung der Restmaterialien der BAL-Proben wurde von der Ethikkommission der LMU genehmigt. Das Einverständnis der jeweiligen Patienten bzw. ihrer Erziehungsberechtigten lag ebenfalls vor.

CF Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
SP-A Level	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ÄKTA -Detergenz	I					I		I			I	I		I	I		I	I		I	I	I	I					
Affi -Detergenz → ÄKTA													I				I	I										I
ÄKTA +Detergenz						I							I															
Affi +Detergenz →ÄKTA						I							I			I	I											
Affi +Detergenz →1 D Gel	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
+ DNase →Affi	I			I	I	I								I	I			I								I		
+ DNase →ÄKTA						I								I				I										

Tab. 2.6: Flow sheet der Analyse der einzelnen CF BAL Proben.

Der Balken an Stelle der Proben CF-1 bis CF-28 bedeutet, dass die entsprechende Probe mit analysiert wurde.

DC Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
SP-A Level	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
ÄKTA -Detergenz	I	I	I	I	I	I	I		I	I	I	I	I	I
Affi -Detergenz	I	I	I						I			I		
ÄKTA +Detergenz									I				I	
Affi +Detergenz	I	I	I	I										I
Affi +Detergenz →1 D Gel	I	I	I	I	I			I		I	I		I	I
+ DNase →Affi	I	I	I	I	I							I	I	I
+ DNase →ÄKTA	I	I												I

Tab. 2.7: Flow sheet der Analyse der einzelnen BAL Proben der Kontrollgruppe.

Der Balken bedeutet, dass die entsprechende Probe mit analysiert wurde.

2.2 Methoden

2.2.1. Quantitative Proteinbestimmung

Material:

- Bio-Rad Proteinassay Farbstoffreagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH No. 500-0006)
- Mikrotiterplatten (Greiner, niedrigaffin, 96 Vertiefungen, transparent)
- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel+Lorei No. 42160223)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
- Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
- PBS-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	0,178 g
NaH ₂ PO ₄	1,560 g
NaCl	8,760 g
H ₂ O	ad 1000 g mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Tabelle 2.2.1: Zusammensetzung des PBS Puffers

Methode:

Die Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Das Bio-Rad Farbstoff-Konzentrat wurde zunächst mit Aqua ad injectabilia 1:5 verdünnt und anschließend durch einen Papierfilter filtriert, um es von Präzipitaten zu befreien.

Für den Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit abnehmenden Konzentrationen von BSA in PBS Puffer hergestellt: 5000 µg/ml, 2500µg/ml, 1250µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml, 78,15 µg/ml. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der einzelnen Standardkonzentrationen und eine Dreifachbestimmung der Proben mit jeweils 5 µl. Zum Anfärben der Proben und Standardlösungen wurden diese mit jeweils 100 µl des Farbstoffreagenzes versetzt. Im Photometer wurde die Absorption bei 600 nm abzüglich des Leerwertes (Leerwert = Bio-Rad Reagenz + BSA) ermittelt und mit Hilfe der Standardreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

2.2.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur quantitativen SP-A Bestimmung

Material:

- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
- Ethylendiamintetraessigsäure – Natrium (Merck 324503)
- Triton X-100 (Sigma No. 9002-93-1)
- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel+Lorei No. 42160223)
- 2,2-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)] = ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid 30% (Merck No. 107298)
- IPS Heizblock für Mikrotiterplatten (Sanofi)
- Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
- Mikrotiterplatten (Nunc, Maxisorp C96)
- Ultraschallbad (Sonorex RK 100, Berlin)
- ELISA Washing Unit (Behring)

- **Carbonatpuffer:**

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 9,6 einstellen

- **TBS Puffer:**

Tris-HCl	10 mM
NaCl	140 mM
Triton-X 100	0,1 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- **Probenpuffer:**

EDTA	1 mM
Tris	10 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- **Blockpuffer:** TBS mit 1% BSA

Verwendete Antikörper und Standard:

- Festphasenantikörper: Japan *Mouse Anti SP-A PE 10* (Dr. Kuroki, International Reagents Corp., Kobe, Japan), monoklonaler Maus Antikörper gegen humanes SP-A
- „Sandwich“ Antikörper SP-A: *Rabbit Anti human SP-A polyclonal Byk Gulden*, polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (ByK Gulden)
- *Goat Anti Rabbit POX*, Anti Kaninchen IgG von Ziege gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (Sigma, Saint Louis, USA)
- Standard Antigen A: *humanes rekombinantes SP-A* , *SPA/00-002* (Byk Gulden)

Methode:

Coating:

Beim Coating wird der erste Antikörper an die Festplatte (Mikrotitelplatte) gebunden. Als Festphasenantikörper wurde PE 10 (Dr. Kuroki, International Reagents Corp., Kobe, Japan), ein monoklonaler Maus-Antikörper, der sich gegen humanes SP-A richtet, verwendet. Er wurde in Carbonatpuffer in einer Konzentration von 1µg/ml gelöst. In alle Vertiefungen (Wells) einer 96-well Mikrotiterplatte (Maxisorp C96, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurden jeweils 100 µl pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Blocking:

Die Lösung und mit ihr der nicht gebundene Antikörper wurde dekantiert und verworfen. Zur Verhinderung von späteren Proteinbindungen an die Kunststoffplatte wird in jede Vertiefung 200 µl Blockpuffer pipettiert. Die Platte wird eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Inkubation mit Antigen:

Zuerst erfolgt das Dekantieren des Überstandes und anschließend wurden alle Reagenzien, die nicht gebunden haben, entfernt, indem jedes Well der Mikrotiterplatte dreimal mit TBS-Puffer gefüllt und anschließend wieder abgesaugt wurde. Dieses Reinigungsverfahren wird vor allen weiteren Schritten in der gleichen Weise durchgeführt.

Bevor die Proben auf die Mikrotiterplatte aufgetragen werden können, müssen sie aufgearbeitet werden, um das SP-A besser aus dem Lipid-Protein-Gemisch zu lösen.

Als Standard Antigen wurde humanes rekombinantes SP-A (rh-SP-A, Byk Gulden, Konstanz) verwendet, der in Verdünnungen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml in Blockpuffer gelöst aufgetragen wurde. Es wurden 2 Standardreihen erstellt, wobei durch zweifache Verdünnung

über 7 Wells der Messbereich des Assays festgelegt wurde. Zwei Wells wurden für den Leerwert nur mit Blockpuffer gefüllt.

Die Proben werden in „Probenpuffer“ fünffach verdünnt und in einem Ultraschallbad 1 Minute homogenisiert. Anschließend wird noch TritonX 22% zugefügt, so dass eine 5,5-fache Verdünnung entsteht. Daraufhin werden die Proben auf dem Vortex-Gerät einige Sekunden lang gemischt und 10 Minuten lang bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wird weiter verwendet und der Bodensatz verworfen. Danach werden 100µl der Proben und 100µl Blockpuffer ins oberste well der Mikrotiterplatte pipettiert, so dass eine 11fache Verdünnung entsteht. Damit alle Proben im Messbereich liegen, werden die Proben auf der Platte weiter verdünnt. In jedes well werden 100µl Pufferlösung und 100µl Proben-Puffer-Gemisch aus dem darüberliegenden Well aufgebracht, so dass 7 weitere Verdünnungsstufen bis zu einer 1408fachen Verdünnung entstehen.

Inkubation mit 2. Antikörper:

Zunächst erfolgte die Entfernung aller ungebundenen Reagenzien, indem jedes Well dreimal mit Pufferlösung gefüllt und anschließend wieder abgesaugt wurde. Der zweite Antikörper, ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (Byk-Gulden/Altana, Konstanz, Deutschland), ist schon 1:100 vorverdünnt und wird weiter 1:100 in Blockpuffer verdünnt. In jedes well werden 100 µl pipettiert. Nach dem Auftragen wird die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend wieder gewaschen.

Detektion des Intermediärkomplexes:

Um den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Intermediärkomplex) zu detektieren, wird ein Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG (Sigma, Saint Louis, USA) verwendet. Dieser Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, einem Enzym, das für die nachfolgende Substratreaktion notwendig ist. Mit Hilfe dieses Enzyms ist die Detektion des Intermediärkomplexes und damit des gesuchten Antigens möglich. Der Antikörper wird 1:5000 in Blockpuffer verdünnt aufgetragen. In jedes well werden 100 µl Antikörper-Puffer-Gemisch aufgetragen. Vor dem nächsten Schritt wird die Platte erneut 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach gewaschen.

Substratreaktion:

Bei der Substratreaktion wird die Fertigschubstanz ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)]) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durch die am Antikörper befindliche Meerrettichperoxidase in ein chromogenes Produkt umgewandelt. ABTS wird als Puffer in einer Konzentration von 0,0167 mg/ml angesetzt. Zu 10 ml ABTS-Puffer werden noch 10 µl 30% iges H₂O₂ und zwei ABTS-Tabletten mit einer Konzentration von 5 mg/Tbl. hinzugegeben. In jedes Well werden dann 100µl Substrat pipettiert. Um zu verhindern, dass die lichtempfindliche Substratreaktion durch Tageslicht gestört wird, wird die Platte mit Aluminiumfolie abgedeckt und bei Raumtemperatur auf einem Schüttler 30 Minuten inkubiert.

Detektion:

Zur Quantifizierung der Färbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Photometers gemessen. Die Berechnung der Standardkurve aus den zwei Standardreihen und dem Leerwert sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software (Hombrechtikon, Schweiz).

Für die weitere Auswertung wurden aus den vom Computer gelieferten Daten die ausgewählt, die im optimalen Messbereich des Assays lagen. Die endgültigen Messergebnisse wurden durch Mittelwertberechnung gebildet. Der optimale Messbereich wurde definiert als der Bereich, in dem mindestens das doppelte Signal des Leerwertes gemessen werden konnte und in dem die Standardkurve steil anstieg.

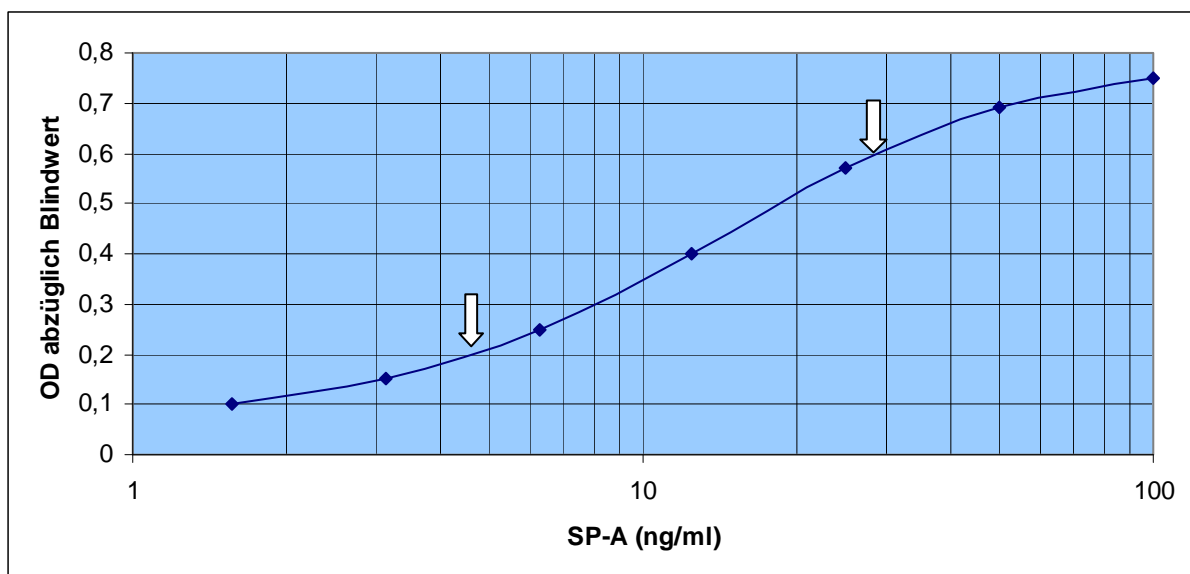


Abb. 2.2.1: Beispiel einer Standardkurve. Der Bereich zwischen den Pfeilen markiert den optimalen Messbereich von 0,2 bis 0,6 OD. Der Leerwert war OD 0,01.

2.2.2 Affinitätschromatographie mit Fucose und Mannose (Säulen- chromatographie bzw. Kohlenhydratbindungsassay)

Material:

- L-Fucose-Agarose (Saline suspension 1ml, Sigma-Aldrich, F3902)
- D-Mannose-Agarose (Saline suspension 1ml, Sigma-Aldrich, M6400)
- 1 ml Säulchen (Mobicols, Mo Bi Tec, M1002)
- Filter (small) 35 µm pore size (Mo Bi Tec, M2135)

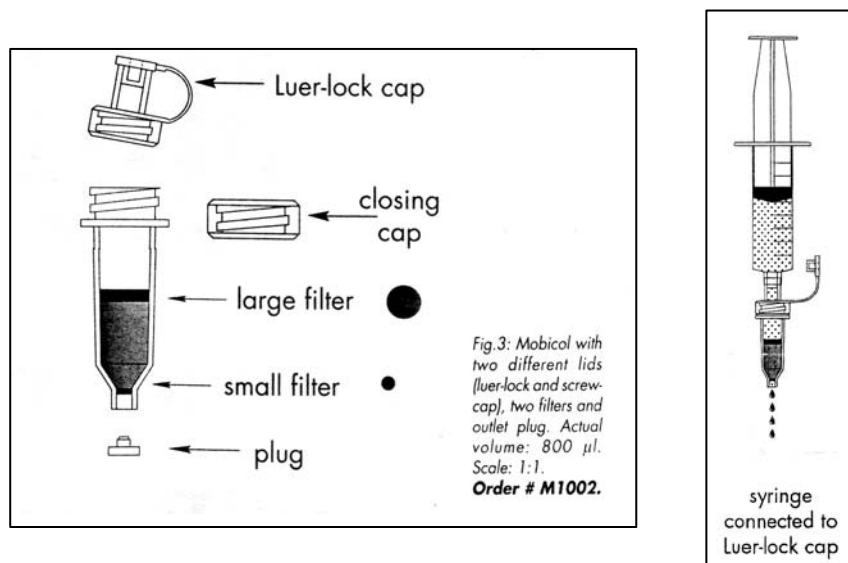


Abb. 2.2.2: Bestandteile des Mobicol 1 ml Säulchen. Bei der vorliegenden Säulenchromatographie wurde der kleine Filter (small filter) verwendet.

Puffer:

- **Kalziumpuffer:**

Hepes	5 mM
CaCl ₂	3 mM
Triton-X 100	0,1 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- **EDTA-Puffer:**

Hepes	5 mM
EDTA	5 mM
Triton-X 100	0,1 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- **Natrium Azid Puffer:**

Na ₃ PO ₄	0,01 M
NaCl	0,15 M
Natrium Azid	1 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- **Natrium Chlorid Puffer:**

NaCl	1 M
in H ₂ O lösen	

Prinzip:

Die Affinitätschromatographie, bzw. die Säulenchromatographie dient der Isolierung von Proteinen aus komplexen Gemischen. Ihr Prinzip beruht auf biospezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei Reaktionspartnern. Die Säulenmatrix enthält einen kovalent gebundenen Liganden, an den das zu isolierende Protein spezifisch bindet und von der er spezifisch eluiert werden kann.

Im Fall der Affinitätschromatographie für SP-A bestehen die Säulenmatrix aus Agarose und der kovalent gebundene Ligand aus Mannose bzw. Fucose. SP-A bindet an diesen Kohlenhydraten, indem es gelöst in Kalziumpuffer auf die Säule geladen wird, durch EDTA-Puffer kann das an Mannose bzw. Fucose gebundene SP-A eluiert werden. Der EDTA-Puffer ist in diesem Fall das Elutionsmittel. Dieses Prinzip lässt sich dadurch erklären, dass das Surfactant Protein A Kohlenhydrate durch die „carbohydrate-binding domain“ bindet, diese Bindung erfolgt kalziumabhängig. Wird Kalzium durch EDTA gebunden, so wird SP-A aus der Bindung an Fucose gelöst und dann von der Säule freigegeben. Die Affinitätschromatographie bzw. das Kohlenhydratbindungsassay wurde nach der Methode von Haagsman durchgeführt (Haagsman et al. 1987).

Methode:

1. Vorbereitung der Mannose- bzw. Fucose- Agarose Säulen

In die Mobicol 1 ml Säule wird der kleine Filter mit Hilfe einer Pinzette eingesetzt. Die Mannose- bzw. Fucose- Agarose Lösung (1 ml) wird in die Mobicol Säule pipettiert. Die Säule wird zunächst mit 10 ml Aqua ad inject. mit Hilfe einer 2 ml Spritze, die in die Verschlusskappe der Mobicol Säule eingesteckt wird (s. Abb 2.2.2) gespült, dadurch wird die Konservierungslösung aus der Säulenmatrix entfernt.

2. Equilibrieren der Säule

Die Säule wird mit insgesamt 10 ml Kalzium Puffer mit Hilfe einer 2 ml Spritze langsam gespült.

3. Laden der Säule mit der Probe

Es werden 100-200 µl bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit jeweils 800-900 µl Kalziumpuffer auf ein Endvolumen von 1 ml verdünnt. Dieses Endvolumen wird dann auf die Mobicol Säule geladen.

4. Eluieren mit Kalzium Puffer

Die Säule wird drei Mal hintereinander mit jeweils 1 ml Kalziumpuffer gespült bzw. eluiert. Die einzelnen 1 ml Fraktionen werden einzeln in Eppendorfhütchen aufgefangen.

5. Eluieren mit EDTA Puffer

Die Säule wird drei Mal hintereinander mit jeweils 1 ml EDTA Puffer gespült bzw. eluiert. Die einzelnen 1 ml Fraktionen werden einzeln in Eppendorfhütchen aufgefangen.

6. Spülen der Säule mit Natrium Chlorid Puffer

Die Säule wird mit 10 ml NaCl 1 M Puffer gespült, dadurch werden die letzten Reste aus der Säulenmatrix entfernt.

7. Lagern der Säule in Natriumazid-Puffer bei 4 bis 8°C Temperatur

Die Säule wird mit 30 ml Natriumazidpuffer gespült und in diesem Puffer aufbewahrt. Die Säule kann dadurch mehrfach verwendet werden.

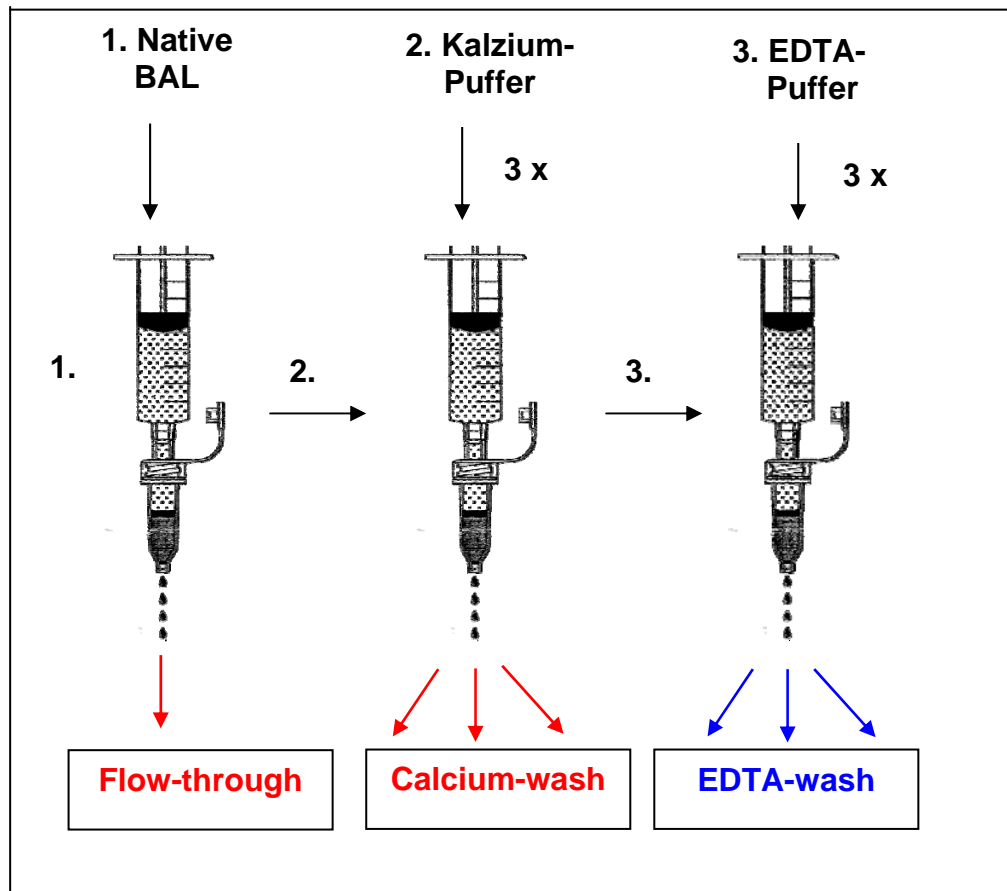


Abb. 2.2.3: Affinitätschromatographie mit Fucose-Säule (1 ml Säule):

schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Elution von SP-A aus der Fucose-Säule:

1. Die bereits mit Kalziumpuffer äquilibrierte Säule wird mit nativer bronchoalveolärer Lavage (BAL) geladen, währenddessen wird der dabei entstehende „*Flow-through*“ gesammelt.
2. Die Säule wird dreimal hintereinander mit Kalzium-Puffer eluiert, dabei werden jeweils drei Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 1 ml gesammelt („*Calcium-wash*“).
3. Zum Schluss wird die Säule dreimal hintereinander mit jeweils 1 ml EDTA-Puffer eluiert, dabei werden jeweils drei Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt („*EDTA-wash*“). In den Fraktionen „*Flow-through*“ und „*Calcium-wash*“ erwartet man das nicht gebundene SP-A eluiert wird, in den „*EDTA-wash*“ Fraktionen hingegen wird das SP-A, das kalziumabhängig an Fucose binden konnte, eluiert.

8. Vorbereitung der Fraktionen:

Material:

- Microcon Zentrifugenfilter, Ausschlussgrenze 3000 Dalton (Microcon YM-3, Millipore, No. 42404)
- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)

Nach Durchführung der Affinitätschromatographie wurden die einzelnen Eluate mit Hilfe von Zentrifugenröhrchen entsalzt, indem die Probe für ca. 40 min bei Raumtemperatur bei 14000 g zentrifugiert wurde und anschließend einmal mit 500 µl Aqua ad injectabilia wieder aufgefüllt und erneut für 40 min nachgespült wurde. Es wurde mit Aqua ad injectabilia nachgespült, um Reste des Detergenz Triton X 100 aus dem Elutionspuffer zu entfernen. Um anschließend das Konzentrat vollständig aus dem Vorlagegefäß zu gewinnen wurde das mit dem Konzentratgefäß verschlossene Vorlagegefäß umgedreht und 3 Minuten lang bei 3.500 Umdrehungen pro Minute rückzentrifugiert. (Abb. 2.2.4)

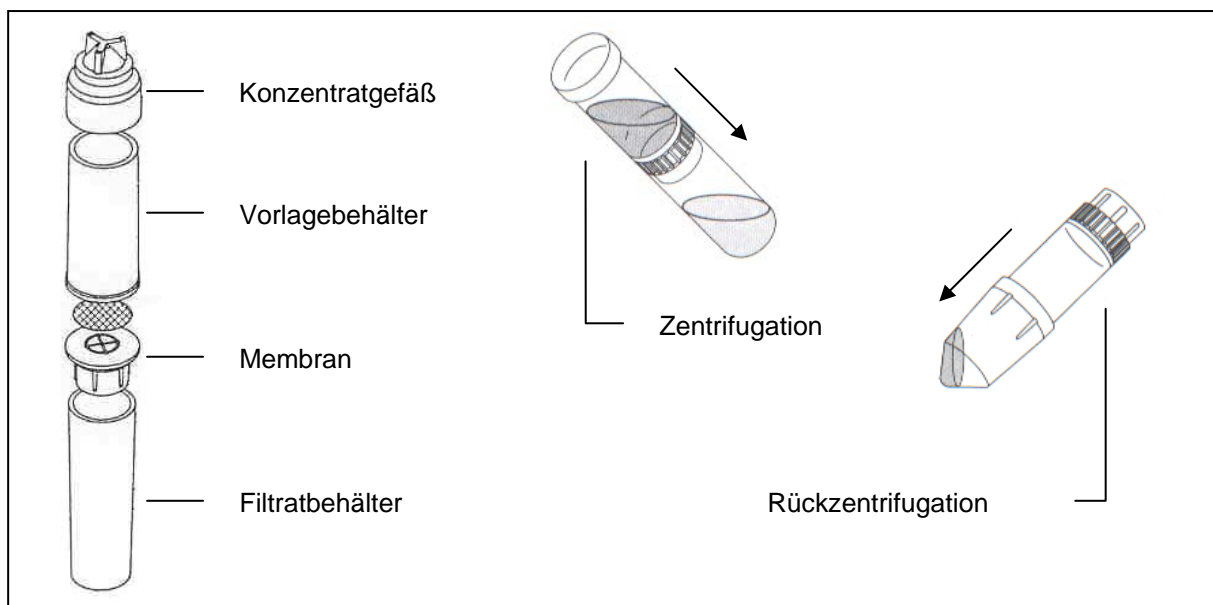


Abbildung 2.2.4: Bestandteile des Mikrokonzentratorkits und Veranschaulichung von Zentrifugation und umgekehrter Zentrifugation

9. Untersuchung der einzelnen Fraktionen durch:

- **Gelelektrophorese**
- **Gelfiltrationschromatographie**
- **Dot-Blot Assay**

Jedes Eluat wurde unter denaturierten und reduzierten Bedingungen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. SP-A wurde mittels Immunoblot detektiert. Die SP-A Oligomerisierung wurde mittels Gelfiltrationschromatographie untersucht. Die einzelnen Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie wurden mittels Dot-blot assay untersucht.

2.2.3. 1-D Gelelektrophorese, Silberfärbung und Westernblotanalyse

Material:

Elektrophorese:

- **PAGE MOPS Running Buffer** (Invitrogen, NP0001)

Zusammensetzung:

MOPS (3-(N-morpholino)propan sulfonische Säure	104,6 g
Tris	60,6 g
SDS	10,0 g
EDTA	3,0 g
Wasser	Ad 500 ml

- **PAGE LDS Sample Buffer** (Invitrogen, NP0007)

Zusammensetzung:

Glycerol	4,0 g
Tris Basis	0,682 g
Tris HCl	0,666 g
LDS	0,800 g
EDTA	0,006 g
Serva Blue G250	0,75 ml 1%
Phenol Red	0,25 ml 1%
Wasser	Bis 10 ml

- Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
- PAGE Reducing Agent (Invitrogen, NP0004)

- **Probenpuffer:**

LDS Sample Buffer	25%
Reducing Agent	10%
H ₂ O	65%

- NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gel (Invitrogen, NP0315)
- NuPAGE Antioxidant (Invitrogen, NP0005)
- Xcell SureLock Minicell Kammer (Invitrogen, EI 0001)
- PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen, EI8700)
- Wasserbad (Paratherm S100 Julabo)
- MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen, LC5725)

Westernblot:

- Xcell II Blot Module (Invitrogen, EI9051)
- **NuPAGE Transfer Buffer** (Invitrogen, NP0006) Zusammensetzung:

Bicine	10,2 g
Bis-Tris	13,08 g
EDTA	0,75 g
Wasser	Bis 125 ml

- PVDF-membran (Millipore, Immobilon IPVH 00010)
- **Transferpuffer:**

NuPAGE Transfer Buffer	5%
Methanol	20%
H ₂ O	75%

Silberfärbung:

- Fixierungslösung:

Ethanol	30%
Essigsäure konzentriert	10%
H ₂ O	60%

- Inkubationslösung:

Natriumacetat	68 g
Ethanol	300 ml
Natriumthiosulfat	2 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

- Silberlösung:

Silbernitrat	2 g
Formaldehyd 37%	200 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

- Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	25 g
Formaldehyd 37%	100 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

Immunodetektion:

- Fischgelatine (Sigma G-7765)
- **TBS-Puffer:**

Tris-HCl	4 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,05 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- **PBS-Puffer:**

Na ₂ HPO ₄	12 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3 mM
NaCl	150 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel No. 42160223)
- ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)
- Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)
- Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)
- Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000)

Methoden:

Die Proben wurden in der Vakuumzenrifuge lyophilisiert und dann in jeweils 22 µl Probenpuffer aufgenommen. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 1000g für 20 Sekunden wurden die Proben 10 Minuten lang im 70°C Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Gelelektrophorese:

Für SP-A wurde MOPS Laufpuffer verwendet. Als Molekulargewichtsmarker diente MultiMark-12. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Kassetten bei: 200 V und 100 mA für 55 min. Nach dem Elektrophoreselauf erfolgte entweder ein Proteintransfer (Westernblot) auf eine PVDF-Membran oder eine Silberfärbung der Gele.

Silberfärbung:

Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Heukeshoven und Dernick (1985) angewendet. Das Gel wurde 30 Minuten in der Fixierungslösung fixiert und anschließend weitere 30 Minuten in der Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen à 15 Minuten wurde das Gel 20 Minuten lang in der Silberlösung versilbert. Nach Zugabe der Entwicklerlösung wurde zwischen 3 und 10 Minuten gewartet, je nach Farbintensität der Banden, und dann die Färbereaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt.

Westernblott:

Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine PVDF-Membran für 60 Minuten bei 30V und 170 mA im NuPAGE Transfer Buffer.

Immunodetektion:

Die Membran wurde 3 Stunden in PBS Puffer mit 3% Fischgelatine inkubiert, um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS Puffer mit 0,5% BSA. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch viermaliges Waschen mit TBS Puffer für jeweils 10 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper in TBS Puffer für 2 Stunden inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit TBS gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung auf Röntgenfilmen entwickelt. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem FluorS Multi Imager eingescanned und mit den Softwareprogrammen Quantity One ausgewertet.

- 1. Antikörper: SP-A Antikörper vom Kaninchen in einer Konzentration von 1:10000
- 2. Antikörper: Polyklonaler IgG Antikörper (goat anti rabbit, Meerrettich- peroxidase konjugiert, Dianova, Hamburg) in einer Konzentration von 1:100000.

2.2.4. Gelfiltrationschromatographie

Material:

- Filter (0,2 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Gerät ÄKTA (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

- Superose-6-Säule (1x30 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Puffer zum equilibrieren der Säule und eluieren

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

Methode:

Die Gelfiltration wurde nach der Methoden von Strong et al (Strong et al. 1998) durchgeführt, sie wurde verwendet um die Surfactantproteine nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Es wurde native BAL (jeweils 1ml) und bereits mittels Fucosesäule eluierte Fraktionen derselben Probe (Pool 1 bzw. „SP-A non-binding“ und Pool 2 bzw. „SP-A binding“ ebenfalls je 1 ml) auf die Superose-6-Säule geladen. Die durch die Fucosesäule eluierten Fraktionen einer Probe wurden zunächst auf zwei Pools aufgeteilt. Pool 1, der den nicht an Fucose bindenden SP-A Anteil enthielt („SP-A non-binding“): hier wurde der Flow-through- und die einzelnen Calcium-Wash-Eluat zusammengefasst. Pool 2 („SP-A binding“): der den an Fucosesäule bindenden SP-A Anteil enthielt (hier wurden die drei EDTA-wash-Komponenten zusammengefasst). Pool 1 und 2 wurden anschließend mit Hilfe des Microcon Zentrifugenhalters entsalzt und jeweils auf 1 ml Gesamtmenge eingeeengt.

Das Prinzip der Gelfiltration:

Die Lösung mit den zu trennenden Molekülen, in diesem Fall die Surfactantproteine, wandern durch die Säule, die ein Gel als chromatographisches Medium enthält. Dieses Gel besitzt Poren unterschiedlicher Größe. Wird nun die Probe aufgetragen und die Pufferlösung kontinuierlich nachgegeben sprich eluiert, so diffundieren die kleineren Moleküle in das Gel während die größeren nicht oder wenig diffundieren können und sich dadurch schneller entlang der Säule nach unten bewegen. Unterhalb der Säule werden jeweils 1 ml Fraktionen entnommen.

Die Proben wurden zunächst über einen Filter (0,2 µm, Sartorius) gegeben und auf eine Superose-6-Säule (1x30 cm, Pharmacia), die mit dem 20 mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 5 mM EDTA Puffer bei pH 7,4 equilibriert ist, aufgebracht. Das Probenvolumen von 1 ml wurde bei

einer Spülgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert und 30 bis 35 Fraktionen à 1 ml entnommen, deren Gehalt an SP-A anschließend mittels Dot-Blot Assay bestimmt.

2.2.5. Dot-Blot Assay für die quantitative SP-A Bestimmung

Die SP-A Konzentration wurde quantitativ mit Hilfe des dot-blotting Geräts (Bio-Rad) gemessen.

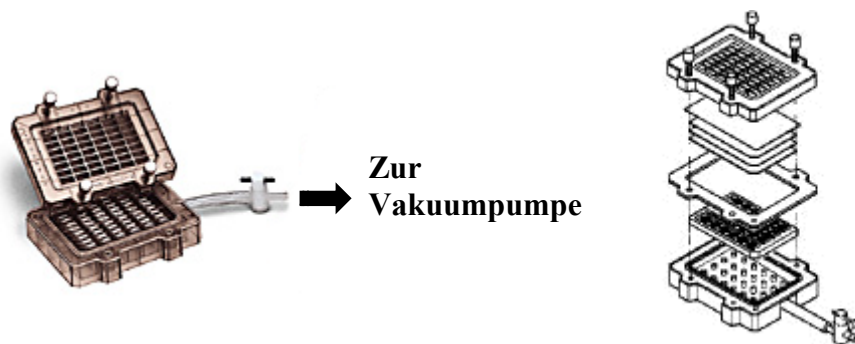


Abbildung 2.2.5: Dot-Blot Gerät und seine Einzelbestandteile

Für das SP-A-dot-blot Assay wurden folgende Puffersysteme benötigt:

- TBS: 10mM Tris-HCl, 140mM NaCl, pH 7.6
- TBS/Methanol Lösung=4 :1
- Blockpuffer: Fisch Gelatine 3%/Tween 1% in TBS
- Waschpuffer: TBS-Tween 1%

Standard:

Als Standard diente humanes rekombinantes SP-A von Byk, Gulden. Die Standardreihe bestand aus 8 Doppelverdünnungen. Die höchste Konzentration lag bei 50 ng SP-A/Slot. In jedem Assay wurde ein Blank ohne SP-A mitgeführt. Der Arbeitsbereich der SP-A Messung lag zwischen 1 und 50 ng.

Bestimmung von SP-A in Proben:

Es wurden 200 µl der Probe auf die Membran aufgetragen. Bestimmte Proben wurden verdünnt bzw. konzentrierter aufgetragen.

Verfahren:

Zunächst wurde das dot-blot Gerät in den Lösungen Detergent IgG Phor für 30 min, 1 N HCl für 30 min und anschließend 1 N NaOH über 30 min gereinigt. Dies ist eine Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung der Messung. Die Sensitivität des Assays ist sehr hoch, weshalb selbst kleine Proteinreste aus früheren Experimenten die Ergebnisse beeinflussen könnten.

Die PVDF Membran und 3 Filterpapiere wurden folgendermaßen vorbereitet:

Die PVDF Membran wurde in 100% Methanol für 1 min gequellt und danach zweimal je 5 min in Wasser gewaschen.

a) enthielten die Proben kein Detergenz (native BAL) so wurden die PVDF Membran und die 3 Filterpapiere zur Equilibrierung in die TBS/Methanol (4 :1) Lösung für 5 min eingelegt. Die equilibrierte Membran und das Filterpapier wurden ins dot-blot Gerät eingebaut und gut verschraubt. Jede Zelle des Geräts wurde mit 200 µl TBS Lösung zunächst gewaschen.

b) enthielten die Proben Detergenz (Elate nach Fucosesäule bzw. zusammengefasst zu Pool 1 und Pool2) so wurden die Membran und die Filterpapiere in TBS mit 1 % SDS/Methanol (4:1) gequellt. Die einzelnen wells wurden mit 200 µl TBS mit 1 % SDS gewaschen.

Danach wurden Standard und Proben einpipettiert und die Pufferflüssigkeit mit Vakuum abgesaugt, sodass die Proteine auf der Blotmembran blieben. Die Membran wurde mit 200 µl TBS Puffer erneut gespült und aus dem Gerät herausgenommen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Blockpuffer Fisch Gelatine 3%/Tween 1% in TBS 1 Stunde lang geblockt.

Anschließend wurde die Membran dreimal in TBS-Tween Lösung gewaschen und danach über Nacht bei 4 Grad mit anti-SP-A Antikörper (1:10000) in Blockpuffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal à 10 min. in TBS-Tween gewaschen, danach 1 Stunde lang mit dem zweiten Antikörper (Goat anti-rabbit POX) inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal in TBS-Tween Lösung gewaschen und anschließend mit ECL-Chemolumineszenzlösung aktiviert und mit Hilfe der Kamera „Diana III“ eingescannt und qualitativ und quantitativ ausgewertet. Zusätzlich wurde die Membran auf einem Röntgenfilm entwickelt.

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms „Graph&Prism“ bearbeitet und graphisch dargestellt.

2.2.6 Quantitation DNA mit Sybr Green

Die DNA Konzentrationen der bronchoalveolären Lavagen (BAL) wurden mittels Sybr Green-Assay gemessen.

Material:

- 1:10 000 Konzentrat Sybr Green li nucleic Acid gel stain 10 000 x concentrate Molecular Probes S7563 size 500 µl: 1:10 000 mit TE-Puffer verdünnen
- **TE Puffer:**

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
In H ₂ O lösen	auf pH 8 einstellen

- Schwarze Fluoreszenzplatten
- Calf thymus DNA size 10 mg (Sigma 89370)
- Calf thymus Stammlösung: 10 mg/ml in Standardpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4 bei 4 ° C), diese wurde nochmals 1:10 verdünnt, dann in je 10 µl aliquotiert.

Methode:

5 µl Probe und 95 µl TE-Puffer (Verdünnung von 1:20), davon werden jeweils 100 µl in ein Well pipettiert.

Standard (5 µl/ml - 78,125 ng/ml):

5 µl des aliquotierten Standards und 998 µl Puffer (c = 5 µg/ml).

In sechs Eppendorfhüttchen werden je 200 µl TE Puffer pipettiert. In das erste Eppendorf werden 200 µl von dem vorbereiteten Standard hineinpipettiert, anschließend wird gut gevortext und daraus werden 200 µl in das zweite Eppendorfhüttchen überpipettiert, usw. bis zum sechsten Eppendorfhüttchen, hier werden dann zum Schluss 200 µl verworfen.

100 µl von dem vorbereiteten Standard werden in das 1. Well, in das 2. Well werden 100 µl vom ersten Eppendorfhüttchen, in das 3. Well werden 100 µl vom zweiten Eppendorfhüttchen pipettiert usw. In das 8. Well werden 100 µl TE Puffer als Blank pipettiert.

Als nächstes wird in jedes Well jeweils 100 µl Sybr Green Lösung gegeben und anschließend die Fluoreszenz gemessen.

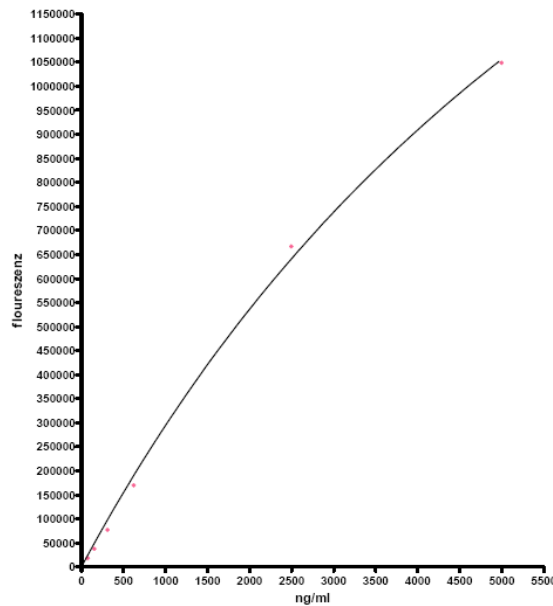


Abbildung 2.2.6.: Beispiel einer Standardkurve für DNA

2.2.7 Inkubation der nativen bronchoalveolären Lavagen mit DNase

Material:

- DNase (Deoxyribonuclease I, Sigma-Aldrich, D5025)
- Puffer:

Tris-HCl	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DNase I	30 units/100 µl Puffer
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen
Pefabloc	

Inkubation 10 min bei 37 °C

Methode:

1 ml nativer BAL wurde mit Deoxyribonuclease I (DNase I) inkubiert und anschließend in der Gelfiltratinschromatographie aufgetrennt. Durch Dnase I Inkubation wird freie aber auch gebundene DNA fragmentiert, es findet allerdings kein vollständiger Abbau der DNA statt.

1 unit DNase I baut ca. 1 µg Plasmid-DNA ab und in Proben maximal 20 µg DNA. In bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit Cystischer Fibrose beträgt die durchschnittliche DNA Konzentration $17,6 \pm 11,2$ µg/ml (Ratjen et al. 2005).

Es wurde 100 µl Puffer für 1000 µl Bronchoalveoläre Lavage Proben verwendet, die Proben wurden bei 37°C für 10 min inkubiert. Nach 10 min wurde die Inkubation gestoppt, indem die Proben kurz auf Eis gelegt wurden.

Es wurden jeweils 1 ml BAL mit DNase I inkubiert, anschließend entsalzt und nach gewohntem Schema wurde die Säulenchromatographie mit Fucose durchgeführt. Hier interessierte uns, ob nach einer Fragmentierung der freien aber auch der an SP-A gebundenen DNA die Bindungsaffinität von SP-A erhöht werden kann.

Um eine mögliche Veränderung der makromolekularen Anordnung von SP-A durch die Inkubation mit DNase I wurden die Proben direkt nach der Inkubation über das Gelchromatographie-Verfahren aufgetrennt. SP-A wurde anschließend mittels Dot-blot assay detektiert.

2.2.8 Inkubation der nativen bronchoalveolären Lavagen mit N-Glykosidase F (NGF)

Material:

- N-Glykosidase F, recombinantes Enzym (Roche, Cat.No.11365185001)
- **Puffer:**

NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	50 mM
EDTA	25 mM
NGF	1 unit/1 µl Puffer
in H ₂ O lösen	auf pH 7,5 einstellen

Methode:

Es wurden Versuche mit N-Glycosidase F durchgeführt, um N-gebundene Oligosaccharide vom SP-A Protein zu lösen. Die Deglykosylierung der BAL Proben erfolgte mit dem rekombinanten N-Glykosidase F Enzym (Roche) in einem 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 bei einer Temperatur von 37°C, die Inkubationszeit betrug 4 bis maximal 24 Stunden.

Dem Inkubtionspuffer wurde 25 mM EDTA zugefügt, um die möglicherweise in der BAL vorhandenen Proteasen zu hemmen.

Es wurden jeweils 20 µl BAL mit 80 µl Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis gelegt, um die Inkubation zu stoppen. Die einzelnen Proben wurden anschließend entsalzt und in der 1-D Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunoblot wurde SP-A detektiert.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Graph Pad Prism 4.01 (San Diego, CA, USA) sowie Microsoft Excel 2000 (San Francisco, CA, USA). Für den Vergleich von mehreren Patientengruppen wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Falls sich damit ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab, wurde ein Vergleich aller Paare mit Hilfe des Post-Tests nach Dunn angeschlossen. Waren lediglich zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Test für ungebundene Stichproben verwendet. Das Konfidenzintervall betrug jeweils 95%. Aus Ergebnissen von Mehrfachmessungen einer Probe wurde jeweils der Mittelwert berechnet und gegebenenfalls der Standardfehler (SEM) angegeben. Innerhalb einer untersuchten Patientengruppe wurden der Median sowie die 25% und 75% Perzentilen berechnet. Für die Korrelationsanalysen wurde der zweiseitige Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. Spearman berechnet. Als relativer Variationskoeffizient wird der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert bezeichnet. Er wird in Prozent angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Parameter

Die klinischen Daten der 28 Patienten mit cystischer Fibrose wurden im Vergleich zu der Kontrollgruppe bestehend aus 14 Patienten mit rezidivierender Bronchitis.

Die Patienten mit cystischer Fibrose waren signifikant älter als die Patienten aus der Kontrollgruppe ($p=0,0055$). Bei folgenden Parametern: Body Mass Index (BMI), Gesamt IgG und IgE im Serum und forcierte Einsekundenkapazität (FEV₁) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tabelle 3.1.). Nur bei den CF Patienten konnte im Rachenabstrich *Pseudomonas aeruginosa* ($n=5$) und *Staphylokokkus aureus* ($n=10$) nachgewiesen werden.

	<i>CF Patienten (n=28)</i>	<i>Kontrollen (n=14)</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Jahre)	11,7 (10,0; 15,1) [1,0-18,8] 28	7,7 (3,3; 10,8) [2,4-17,00] 14	0,0055*
Geschlecht (w/m)	11/17	8/6	
BMI (kg/m ²)	17,8 (15,7; 19,3) [13,7-23,2] 28	19,4 (15,0; 21,9) [14,0-26,3] 14	0,3932
FEV ₁ (% Soll)	86,3 (78,5; 102,5) [52,0-120,3] 28	93,5 (63,6; 101,0) [53,4-119,8] 8	0,8194
IgG Serum (mU/ml)	1070 (814; 1260) [389-1940] 23	823,9 (720; 11008) [681-1230] 10	0,0525
IgE Serum (mU/ml)	32,6 (12,35; 98,6) [0,1-724] 21	79,7 (11,3; 96) [4,9-121] 9	0,5563
Staph.au	10	0	
P. ae.	5	0	

Tabelle 3.1 Klinische Parameter der CF Patienten und der Kontrollgruppe im Vergleich.

Die CF Patienten waren signifikant älter und sie waren besiedelt mit *Staphylokokkus aureus* (Staph. au.) bzw. *Pseudomonas aeruginosa* (P. ae.). Bezüglich der anderen Parameter gab es keine Unterschiede.

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet. * statistisch signifikant.

3.2. Zytospin

Die folgende Tabelle (Tabelle 3.2) zeigt die Ergebnisse der in der Pool-Fraktion der bronschoalveolären Lavage (BAL) ermittelten Zytospinwerte der Patienten mit cystischer Fibrose im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Die Gesamtzellzahl der CF BAL war signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der Differential-Zellzählung konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich einer höheren Neutrophilenzahl und einer niedrigen Lymphozyten- und Makrophagenzahl in der CF Patientengruppe festgestellt werden. Die Eosinophilen- und Basophilenzahl war bei beiden Gruppen gleich.

	<i>CF Patienten (n=28)</i>	<i>Kontrollen (n=14)</i>	<i>p-Wert</i>
Recovery (%)	80,0 (66,0; 90)[47,0-100,0] 22	75,0 (66,0; 89,5) [54,0-100,0] 12	0,5713
Vitalität (%)	83,0 (70,5; 86,5) [8,0-98,0] 24	87,0 (72,5; 93,3) [50,0-100,0] 12	0,1481
Gesamtzellzahl (/µl)	9750 (2550; 24800) [0,5-237850] 28	155 (72,5; 267,5) [20,0-495,0] 13	<0,0001*
Makrophagen (%)	60,5 (38,6; 76,0) [2,0-93,2] 28	75,0 (67,0; 87,5) [62,0-94,5] 13	0,0085*
Neutrophile (%)	29,40 (12,3; 53,5) [0,5-98,0] 28	2,50 (1,50; 4,00) [0-9,00] 12	<0,0001*
Lymphozyten (%)	6,0 (2,2; 8,8) [0-71,0] 28	20,0 (10,5; 25,7) [3,0-32,0] 13	0,0007*
Eosinophile (%)	0 (0; 0,4) [0-21,0] 25	0 (0; 0,8) [0-3,0] 6	0,7030
Basophile (%)	0 23	0 (0;0) [0-0,5] 2	

Tabelle 3.2: Zelldaten der bronchoalveolären Lavagen der CF Patienten und der Kontrollgruppe. Die CF BAL zeigte eine signifikant höhere Gesamtzellzahl und Neutrophilenzahl hingegen waren die Lymphozyten- und Makrophagenzahl der CF BAL signifikant niedriger. Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte: **Median** (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet. * statistisch signifikant.

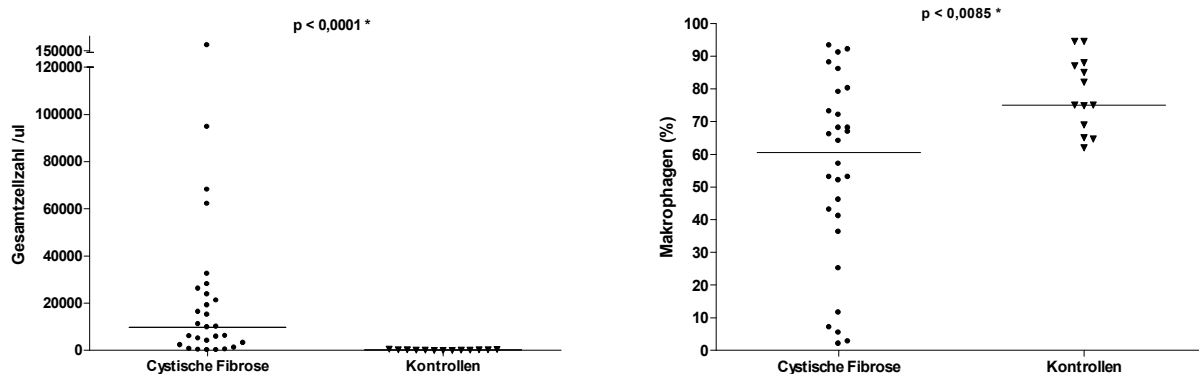


Abb. 3.1.: Gesamtzellzahl und Makrophagenanzahl der BAL von Patienten mit cystischer Fibrose und Kontrollen im Vergleich. Die CF BAL zeigt eine signifikant höhere Gesamtzellzahl und eine niedrige Makrophagenzahl im Vergleich zu den Kontroll BAL. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane. * statistisch signifikanter Mann-Whitney-Test.

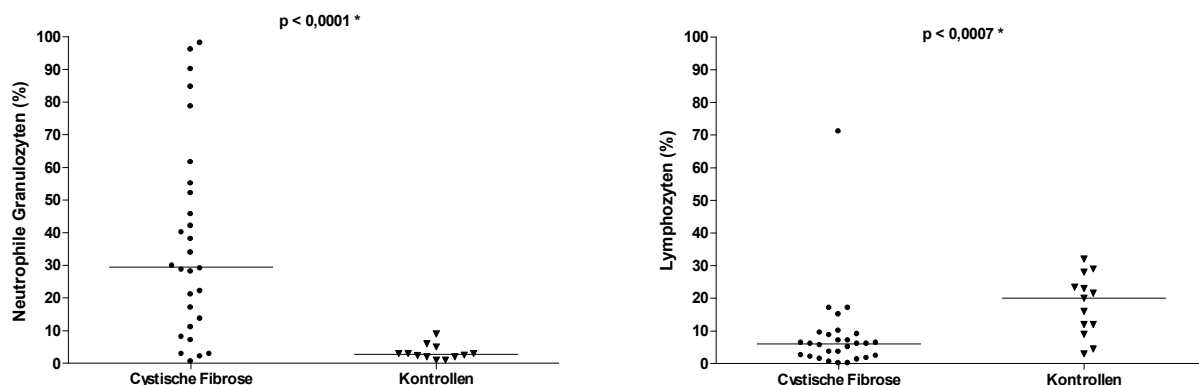


Abb. 3.2.: Neutrophile Granulozytenzahl (%) und Lymphozytenzahl der BAL von Patienten mit cystischer Fibrose und Kontrollen im Vergleich. Die CF-BAL zeigen eine signifikant höhere Neutrophilenzahl und eine niedrige Lymphozytenzahl im Vergleich zu den Kontroll BAL. Dargestellt sind die Einzelwerte und Mediane. * statistisch signifikanter Mann-Whitney-Test.

Folgerungen zu 3.1. und 3.2.:

- Die klinischen Daten der Patienten mit cystischer Fibrose und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nur bezüglich des Alters: die CF Patienten waren signifikant älter.
- Die CF BAL zeigt eine signifikant höhere Gesamtzellzahl und eine höhere Neutrophilenzahl im Vergleich zur BAL der Kontrollen.
- Die CF BAL zeigt eine signifikant niedrigere Makrophagen- und Lymphozytenzahl im Vergleich zu den Kontrollen.

3.3 Surfactant Protein A (SP-A) bei cystischer Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe

a) Surfactant Protein A (SP-A) Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage

In Tabelle 3.3. sind die Proteinkonzentrationen der BAL und die im ELISA gemessenen Surfactant Protein A (SP-A) Konzentrationen der CF Patienten und der Kontrollgruppe im Vergleich dargestellt. Sowohl der Vergleich der Proteinkonzentrationen der Lavagen als auch der Vergleich der SP-A Konzentrationen beider Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Medianwerte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen ($p=0,32$).

Gruppe	Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	SP-A (ng/ml)
CF-Patienten	94,2 (73,2; 141,9) [21,9 – 477,5] 28	4861 (3390; 6113) [948 – 13624] 28
Kontrollen	73,2 (53,7; 130,6) [24,0 – 196,6] 14	2724 (1407; 8253) [425 – 20390] 14

Tabelle 3.3: Proteinkonzentrationen und SP-A Konzentrationen in der BAL der CF- und Kontroll-Gruppe: der Vergleich ergab jeweils keinen signifikanten Unterschied.

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte.

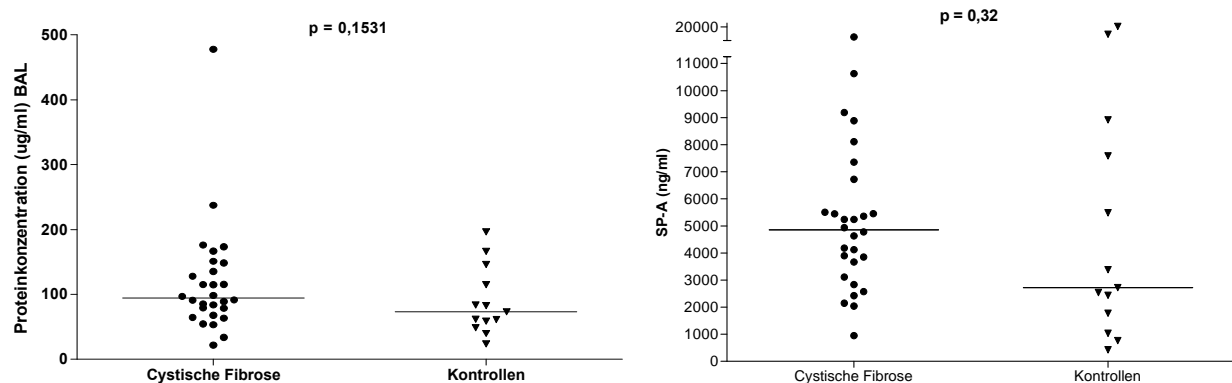


Abb. 3.4: Proteinkonzentrationen und SP-A-Konzentrationen der BAL der CF Gruppe und der Kontrollgruppe im Vergleich. Die Symbole im linken Bild entsprechen der einzelnen Proteinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und im rechten Bild der SP-A Konzentrationen (ng/ml), dargestellt sind die Median Werte. Beide Gruppen unterscheiden sich statistisch nicht bez. der Protein- und der SP-A Konzentrationen der BAL voneinander.

b) SP-A Konzentrationen in der CF BAL: Bezug zum Keimnachweis

Der Vergleich der im ELISA gemessenen SP-A Konzentrationen in der CF Gruppe bezogen auf einen negativen oder positiven Keimnachweis im Sputum oder in der BAL ergab keinen signifikanten Unterschied. Genauso ergab der Vergleich von *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Staphylokokkus aureus* Nachweis keinen Unterschied bezogen auf die SP-A Konzentration in der BAL (s. Abb. 3.5 und 3.6).

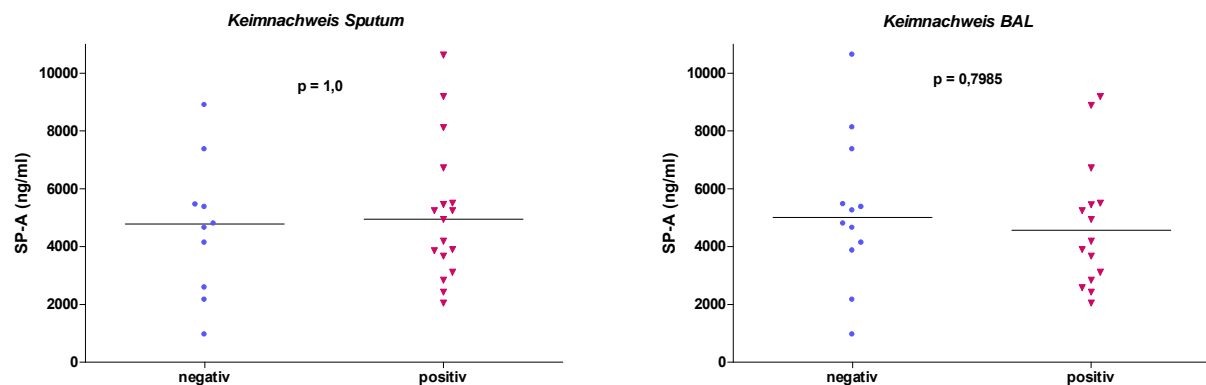


Abb. 3.5: Vergleich der SP-A Konzentrationen innerhalb der CF Gruppe bezogen auf einen negativen bzw. einen positiven Keimnachweis im Sputum (links) und in der BAL (rechts). Es konnte kein signifikanter Unterschied der SP-A Konzentrationen abhängig vom Keimstatus gefunden werden.

Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen (ng/ml), dargestellt sind die Median Werte. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

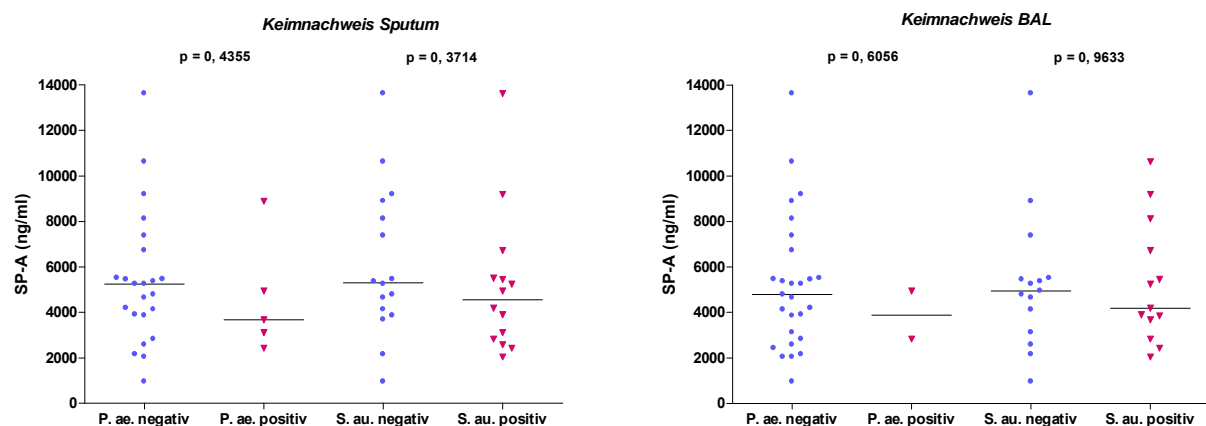


Abb. 3.6: Vergleich der SP-A Konzentrationen innerhalb der CF Gruppe mit negativen bzw. positiven Keimnachweis für *Pseudomonas aeruginosa* (P. ae.) und *Staphylokokkus aureus* (S. au.) im Sputum (links) und BAL (rechts). Es konnte kein signifikanter Unterschied der SP-A Konzentrationen abhängig vom *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Staphylokokkus aureus* Nachweis gefunden werden.

Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen (ng/ml), dargestellt sind die Median Werte. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

c) SP-A Konzentrationen und klinische Parameter beider Gruppen

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Surfactantprotein A (SP-A) in der BAL und den klinischen Parametern (Alter, BMI und Lungenfunktion) von CF-Patienten gibt, wurden die SP-A Konzentrationen mit den jeweiligen klinischen Parametern, die zum Zeitpunkt der Lavage ermittelt wurden, verglichen. Die Korrelationen der CF-Patienten wurden in Abb. 3.7 und 3.8. diesen aus der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Sowohl in der CF-Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration an SP-A in der BAL und des Patientenalters, der BMI Werte und der FEV₁-Werte gezeigt werden.

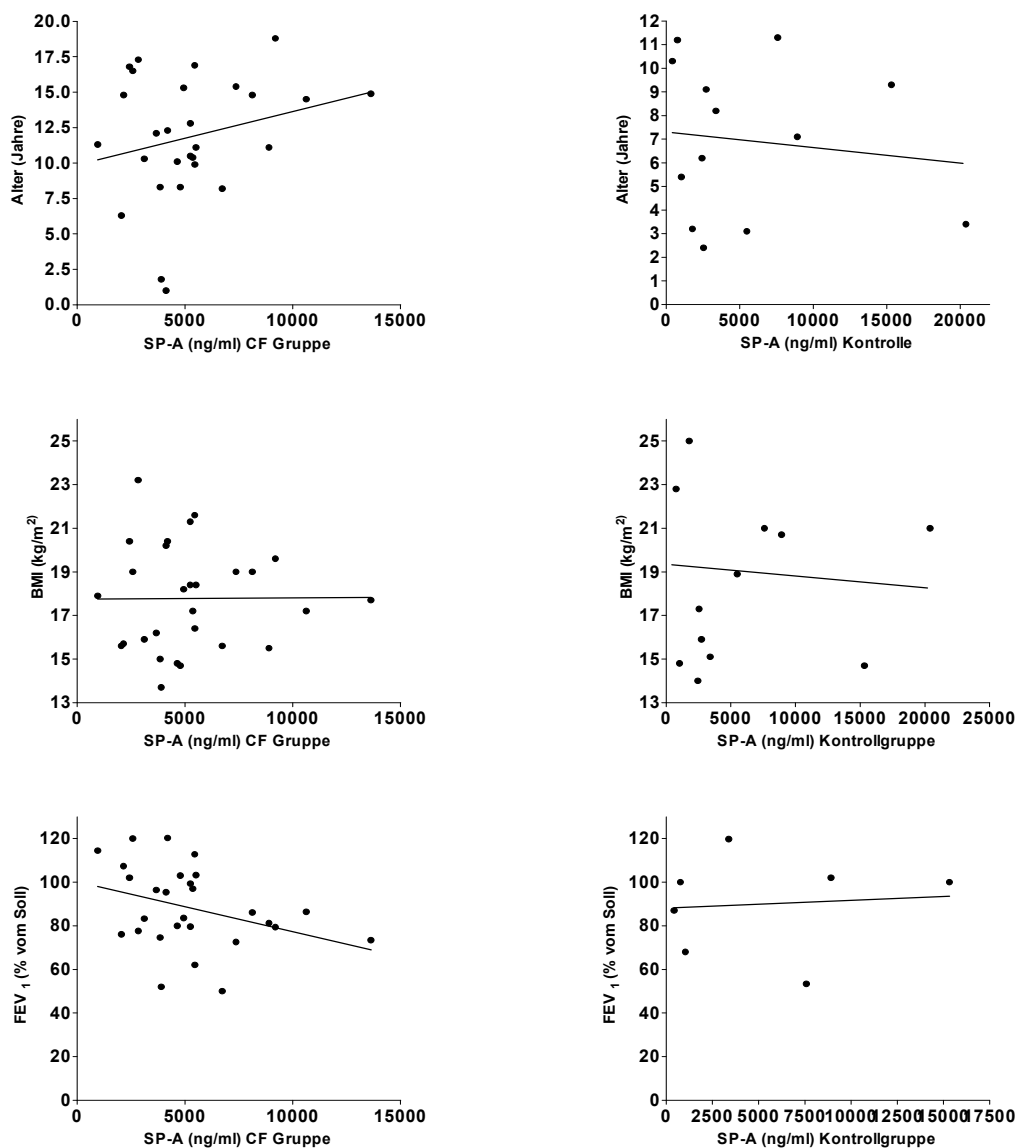


Abb. 3.7: Korrelation zwischen der Surfactant Protein A (SP-A) Konzentration im ELISA und den klinischen Parametern der CF- und Kontrollgruppe als Gegenüberstellung.

Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen (ng/ml). Die Regressionsgerade ist dargestellt. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SP-A Konzentration in der BAL und den klinischen Parametern (Alter, BMI und FEV₁) bei beiden Gruppen gefunden werden.

Darüber hinaus wurden die Korrelation zwischen den SP-A Konzentration und den IgG- und IgE Konzentrationen im Serum der beiden Gruppen ermittelt. Nur die SP-A Konzentrationen der CF-Gruppe zeigten einen signifikanten Zusammenhang zur IgE Konzentration im Serum ($p = 0,0041$). *Je höher die IgE Konzentration im Serum des CF-Patienten desto höher die SP-A Konzentration in der bronchoalveolären Lavage.*

In beiden Gruppen konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den IgG Konzentrationen und SP-A Konzentrationen ermittelt werden (s. Abb. 3.8)

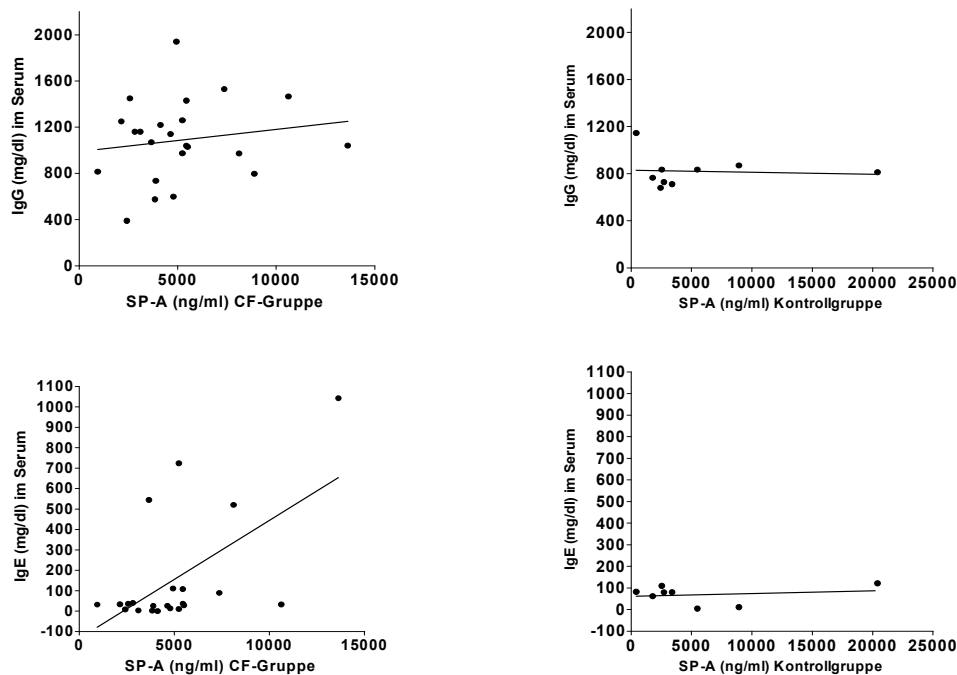


Abb. 3.8: Korrelation zwischen der Surfactant Protein A (SP-A) Konzentration im ELISA und den IgE- und IgG-Konzentrationen im Serum der CF-Gruppe und Kontrollgruppe als Gegenüberstellung.

Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen (ng/ml). Die lineare Regressionskurve ist dargestellt.

Nur in der CF Gruppe konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen SP-A Konzentration und IgE-Konzentrationen im Serum gefunden werden: *je höher die IgE Konzentration desto höher die SP-A Konzentration.*

<i>Cystische Fibrose</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r^2</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Jahre)	28	0,2083	0,06018
BMI (kg/m ²)	28	0,00004324	0,9735
FEV ₁ (% Soll)	28	0,1209	0,0698
IgG Serum (mU/ml)	23	0,02554	0,4664
IgE Serum (mU/ml)	22	0,3443	0,0041 *

Tab. 3.4: Korrelation zwischen der Konzentration an Surfactant Protein A (SP-A) und klinische Parameter der Patienten mit Cystischer Fibrose. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte.

<i>Kontrollen</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r^2</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Jahre)	13	0,01528	0,6874
BMI (kg/m ²)	13	0,006312	0,7964
FEV ₁ (% Soll)	7	0,007698	0,8516
IgG Serum (mU/ml)	8	0,005818	0,8454
IgE Serum (mU/ml)	9	0,03653	0,6503

Tab. 3.5: Korrelation zwischen der Konzentration an Surfactant Protein A (SP-A) und klinische Parameter der Kontrollen. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte.

Folgerungen zu 3.3. a)-c):

- Die SP-A Konzentrationen der bronchoalveolären Lavagen (BAL) der cystischen Fibrose Gruppe und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.
- Es besteht kein Zusammenhang zwischen einem positiven Keimnachweis (*Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Staphylokokkus aureus*) und der SP-A Konzentration der BAL der CF Gruppe.
- Nur in der CF Gruppe konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der SP-A Konzentration in der BAL und der IgE-Konzentrationen im Serum festgestellt werden: je höher die IgE Konzentration desto höher die SP-A Konzentration.

d) SP-A Konzentrationen und BAL Zelldaten beider Gruppen

Die SP-A Konzentrationen beider Gruppen wurden mit den jeweiligen BAL Zelldaten verglichen (s. Abb. 3.9). Die SP-A Konzentrationen beider Gruppen korrelierten nicht mit der Gesamtzellzahl der Lavagen. Nur innerhalb der Patientengruppe mit cystischer Fibrose zeigte die SP-A Konzentrationen eine statistisch signifikante Korrelation mit der Neutrophilenanzahl ($p=0,0178$): *je höher die Neutrophilenanzahl in der BAL desto höher die die SP-A Konzentration in der BAL der CF Patienten*. Darüber hinaus bestand ein negativer Zusammenhang zwischen SP-A Konzentration und Makrophagenanzahl in der BAL der CF Gruppe ($p=0,0205$): *je höher die Makrophagenzahl in der BAL desto niedriger die SP-A Konzentration in der BAL*.

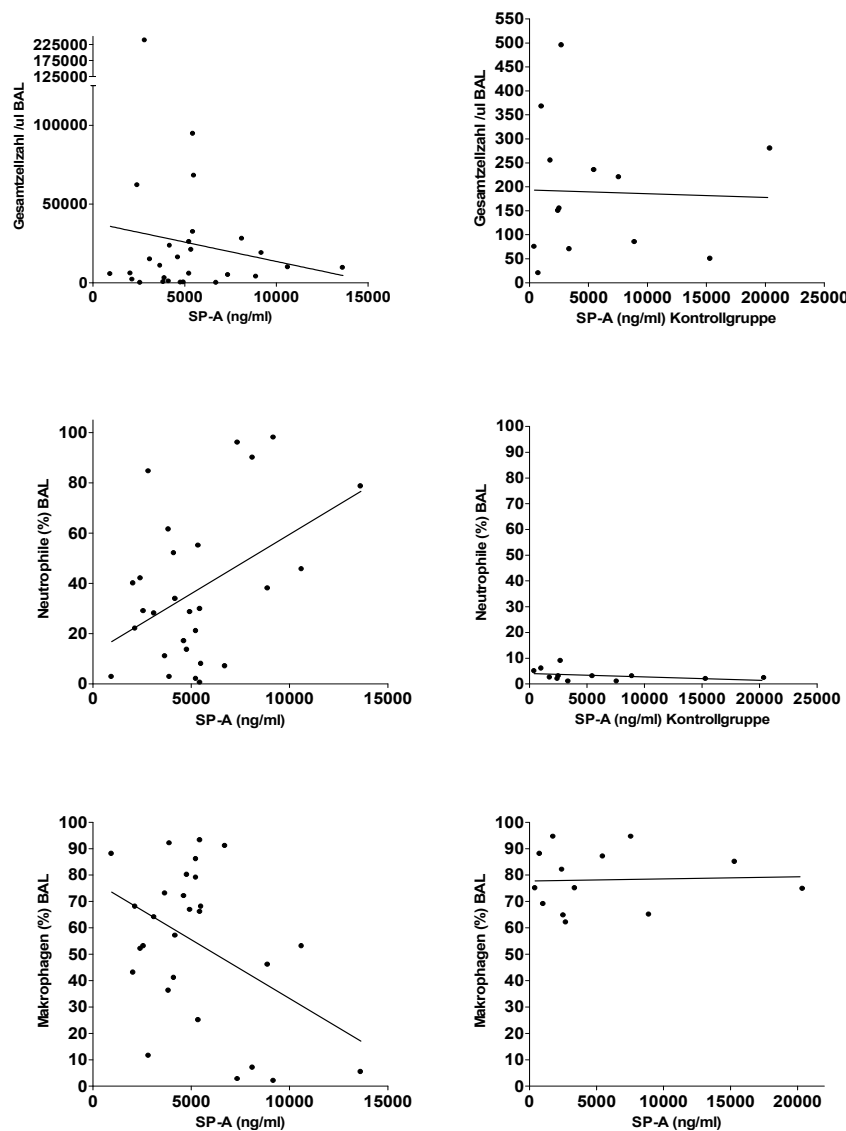


Abb. 3.9 a: Korrelation zwischen der Surfactant Protein A (SP-A) Konzentration und der BAL Zelldaten der CF Gruppe und Kontrollgruppe als Gegenüberstellung. Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen (ng/ml). Lineare Regressionskurve ist dargestellt. **Nur in der CF Gruppe konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Neutrophilen- bzw. Makrophagenzahl der BAL und der SP-A Konzentration gefunden werden.**

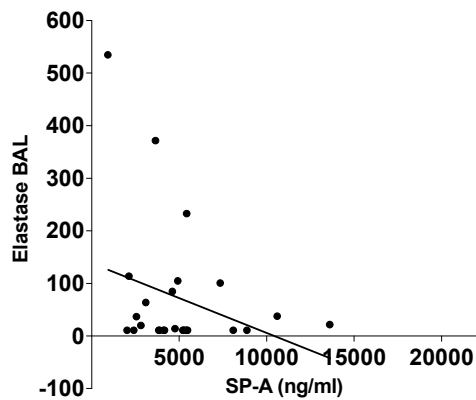


Abb. 3.9 b: Korrelation zwischen der Surfactant Protein A (SP-A) Konzentration und der BAL Elastase der CF Gruppe. Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen (ng/ml). Lineare Regressionskurve ist dargestellt..

<i>Cystische Fibrose</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r^2</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamtzellzahl (/μl)	28	0,02144	0,4572
Makrophagen (%)	28	0,1898	0,0205 *
Neutrophile (%)	28	0,1974	0,0178 *
Lymphozyten (%)	28	0,01141	0,5885
Eosinophile (%)	28	0,0007204	0,8922
Elastase	21	0,08820	0,1407

Tab. 3.6: Korrelation zwischen der SP-A Konzentration und der BAL Zelldaten der Patienten mit Cystischer Fibrose.

Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

<i>Kontrollen</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r^2</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamtzellzahl (/μl)	13	0,001156	0,9122
Makrophagen (%)	13	0,001848	0,8891
Neutrophile (%)	12	0,1274	0,2548
Lymphozyten (%)	13	0,00072	0,9307
Eosinophile (%)	13	0,1107	0,2668

Tab. 3.7: Korrelation zwischen der SP-A Konzentration und der BAL Zelldaten der Kontrollen.

Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

e) Korrelation zwischen den SP-A Konzentrationen und den klinischen Parametern bei Cystischer Fibrose abhängig vom mikrobiologischen Befund

Die Patienten mit cystischer Fibrose wurden bezüglich des mikrobiologischen Befundes der BAL in zwei Gruppen (negativer und positiver Keimnachweis) aufgeteilt. Es wurde der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Surfactantprotein A (SP-A) in der BAL und den klinischen Parametern (Alter, BMI und Lungenfunktion) innerhalb der Gruppe der CF Patienten mit positiven mikrobiologischen Befund untersucht und mit der Gruppe mit negativen mikrobiologischen Befund verglichen.

Bei beiden Gruppen konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den SP-A Konzentrationen und Alter, BMI und Serum IgG der Patienten festgestellt werden.

Innerhalb der Gruppe mit negativem mikrobiologischen Befund waren signifikante Unterschiede zwischen der SP-A Konzentration und den FEV1 Werten festzustellen: *je niedriger die FEV1 Werte umso höher die SP-A Konzentration in der BAL* ($p=0,0067$). Differenziert man innerhalb dieser Gruppe, so ist die Signifikanz nur innerhalb der Staphylokokkus aureus negativen BAL vorhanden ($p=0,0079$).

Nur innerhalb der Gruppe mit negativem mikrobiologischen Befund waren signifikante Unterschiede zwischen der SP-A Konzentration und der IgE Konzentration im Serum festzustellen: *je höher die IgE Konzentration im Serum umso höher die SP-A Konzentration in der BAL* ($p=0,007$). Differenziert man auch innerhalb dieser Gruppe, so ist die Signifikanz sowohl bei der Pseudomonas negativen ($p=0,028$) wie auch bei der Staphylokokkus aureus negativen BAL ($p<0,0001$) vorhanden.

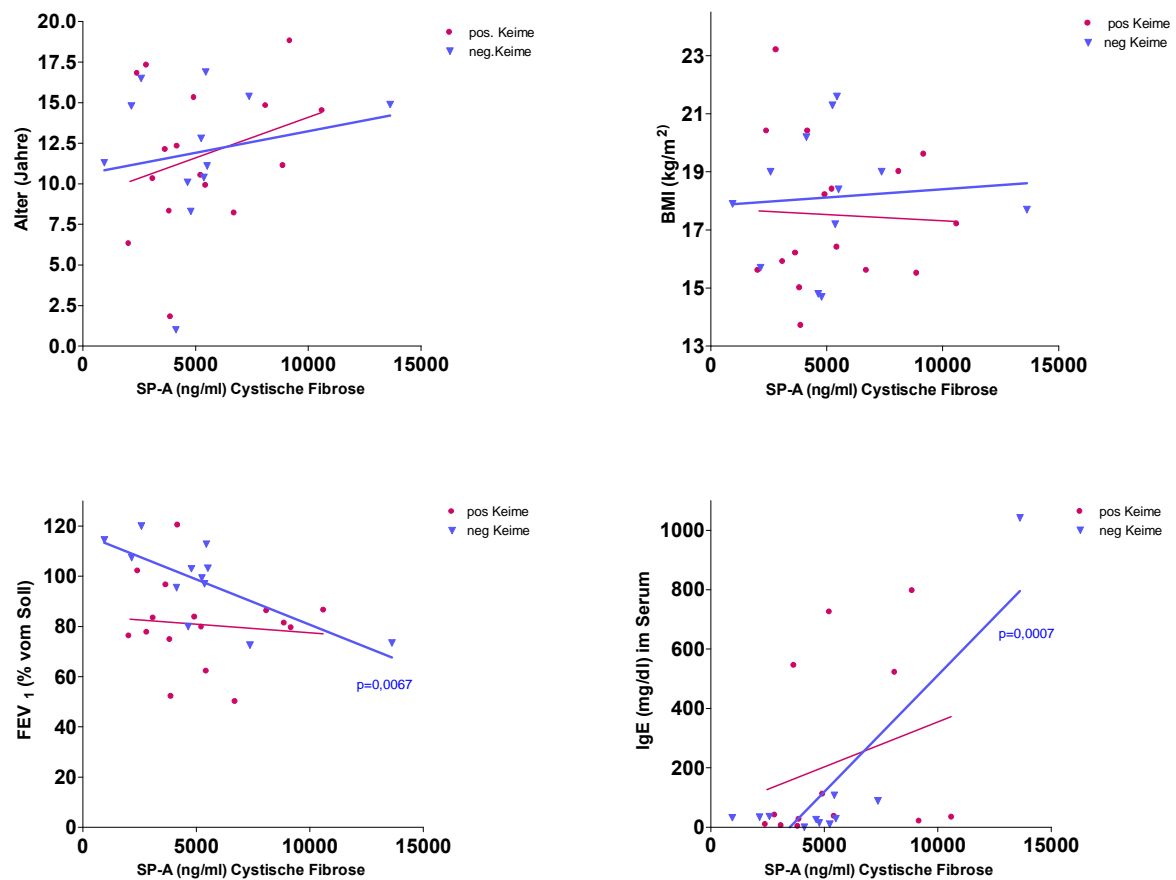


Abb. 3.10: Korrelation zwischen der Konzentration an Surfactant Protein A (SP-A) und der klinischen Parameter bei Patienten mit cystischer Fibrose mit positiven und negativen mikrobiologischen Befund im Vergleich. Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen in ng/ml. Lineare Regressionskurve ist dargestellt.

Nur innerhalb der Gruppe mit negativem Keimnachweis konnte eine signifikante Korrelation zwischen der SP-A Konzentration in der BAL und der FEV₁ – und den IgE-Werten gefunden werden.

Positiver Keimnachweis	Werte- are	Spearman r^2	p-Wert
Alter (Jahre)	16	0,08837	0,2635
BMI (kg/m ²)	16	0,001994	0,8696
FEV ₁ (% Soll)	16	0,01053	0,7053
IgG Serum (mU/ml)	13	0,00097	0,9194
IgE Serum (mU/ml)	13	0,07347	0,3704
negativer Keimnachweis	Werte- are	Spearman r^2	p-Wert
Alter (Jahre)	12	0,03639	0,5526
BMI (kg/m ²)	12	0,006297	0,8063
FEV ₁ (% Soll)	12	0,5369	0,0067*
IgG Serum (mU/ml)	11	0,0020	0,8961
IgE Serum (mU/ml)	11	0,7407	0,0007*

Tab. 3.8: Korrelation zwischen der Surfactant Protein A (SP-A) Konzentration und klinische Parameter der CF BAL abhängig vom positiven oder negativen Keimnachweis.

Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Surfactantprotein A (SP-A) in der BAL und den BAL Zellzahlen innerhalb der Gruppe der CF Patienten mit positiven mikrobiologischen Befund untersucht und mit der Gruppe mit negativen mikrobiologischen Befund verglichen. Bei beiden Gruppen konnte keine signifikante Korrelation zwischen SP-A Konzentration und der Gesamtzellzahl, Lymphozyten- und Eosinophilenanzahl der BAL festgestellt werden (s. Abb.3.11).

Innerhalb der Gruppe mit negativem mikrobiologischen Befund waren signifikante Unterschiede zwischen der SP-A Konzentration und den Makrophagenanzahl festzustellen: *je höher die Makrophagenanzahl in der BAL desto niedriger die SP-A Konzentration in der BAL* ($p=0,0179$). Bei den CF Patienten ohne Keimnachweis bestand ein positiver Zusammenhang zwischen Neutrophilenanzahl in der BAL und SP-A Konzentration ($p=0,0288$) (s. Abb. 3.11). Differenziert man auch innerhalb dieser Gruppe, so ist die Signifikanz sowohl bei der Pseudomonas negativen ($P=0,0043$) wie auch bei der Staphylokokkus aureus negativen BAL ($p=0,0165$) vorhanden.

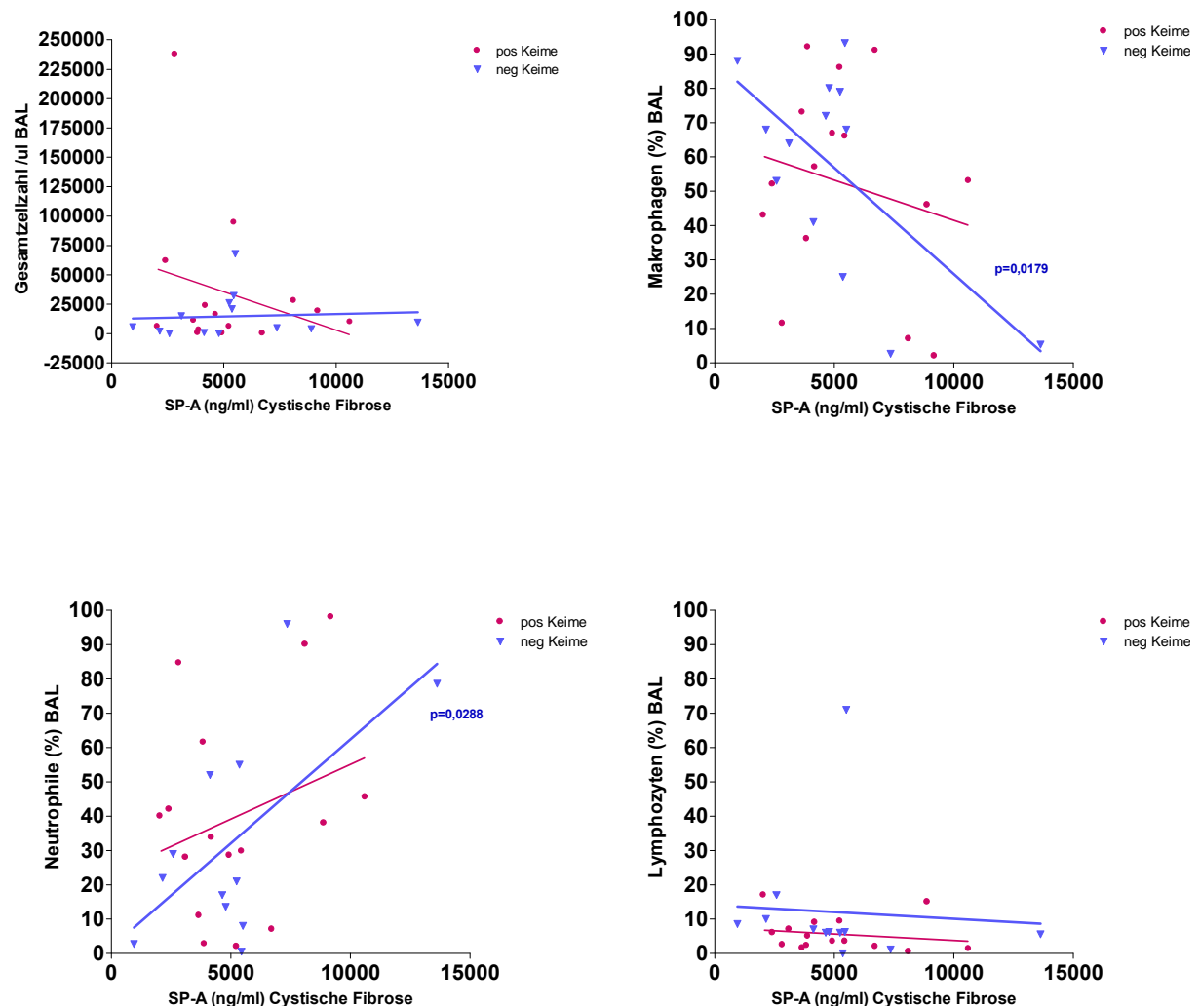


Abb. 3.11: Korrelation zwischen der SP-A Konzentration und der BAL Zellzahlen bei Patienten mit cystischer Fibrose mit positiven und negativen mikrobiologischen Befund. Die Symbole entsprechen der einzelnen SP-A Konzentrationen in ng/ml. Lineare Regressionskurve ist dargestellt.

Nur innerhalb der Gruppe mit negativem mikrobiologischem Befund (blau) konnten signifikante Korrelationen zwischen der SP-A Konzentrationen und der Makrophagen- und Neutrophilenzahlen gefunden werden.

Positiver Keim-nachweis	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r^2</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamtzellzahl (/µl)	15	0,06912	0,3438
Makrophagen (%)	15	0,04618	0,4418
Neutrophile (%)	16	0,07835	0,2937
Lymphozyten (%)	15	0,03501	0,5043
Eosinophile (%)	7	0,1050	0,4782

negativer Keim-nachweis	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r^2</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamtzellzahl (/µl)	13	0,005182	0,8152
Makrophagen (%)	13	0,4128	0,0179 *
Neutrophile (%)	12	0,3943	0,0288 *
Lymphozyten (%)	13	0,00439	0,8377
Eosinophile (%)	5	0,01136	0,8645

Tab. 3.9: Korrelation zwischen der SP-A Konzentrationen und der BAL Zellzahlen der CF BAL abhängig vom positiven oder negativen Keimnachweis.

Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

Folgerungen zu 3.3. d)-e):

- Für die cystische Fibrose Gruppe gilt:
 - je höher die Neutrophilenzahl der BAL desto höher die SP-A Konzentration.
 - je höher die Makrophagenzahlen der BAL desto niedriger die SP-A Konzentration.
- Nur innerhalb der CF Gruppe mit negativem Keimnachweis gilt:
 - je niedriger die FEV1 desto höher die SP-A Konzentration.
 - je höher der IgE Wert desto höher die SP-A Konzentration.

3.4 Makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) der bronchoalveolären Lavagen der CF- und Kontrollgruppe im Vergleich

Versuche ohne Detergenz

Ziel der folgenden Versuchen war es, die makromolekulare Organisation von pulmonalem Surfactant Protein A (SP-A) darzustellen. Hierzu wurden die bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) und von der Kontrollgruppe mittels Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt. SP-A wurde anschließend mittels Dot-blot-Assay nachgewiesen.

Bei diesen Versuchen wurde SP-A unter nativen Bedingungen (die Proteine der BAL werden für die Darstellung nicht denaturiert oder reduziert wie z.B. bei der 1 D Gelelektrophorese) dargestellt. Folglich ist das eine Möglichkeit die komplexen oligomeren Formen der SP-A Proteine darzustellen. Vom besonderen Interesse war es, zu untersuchen, ob die native CF BAL eine andere Zusammensetzung der komplexen oligomeren Formen hat im Vergleich zur Kontroll BAL.

3.4.1 Analyse der SP-A Struktur der nativen CF- und Kontroll-BAL mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA)

Hierzu wurden jeweils 1 ml der nativen bronchoalveolären Lavagen der CF Gruppe (n=13) und der Kontrollgruppe (n=13) mittels Gelfiltrationschromatographie über eine Sepharose 6 Säule mit Hilfe des Gerätes ÄKTA (s. Methoden 2.2.4) nach der Größe der Proteine aufgetrennt. SP-A wurde ebenfalls der Größe nach in die verschiedenen Oligomeren Formen aufgetrennt. Der SP-A Gehalt der in 1 ml-Fractionen gewonnenen 31 Eluaten wurde mittels Dot-Blot Assay bestimmt (s. Methoden 2.2.5).

In Abb. 3.12 ist der SP-A Gehalt der einzelnen eluierten 31 Fraktionen als Prozent vom Gesamt SP-A Gehalt angegeben. Dargestellt als rote Kurven sind die Mittelwerte der untersuchten CF- und Kontroll Lavagen (s. Abb.3.13).

SP-A wird in drei großen Peaks eluiert:

der erste Peak ist in Fraktion 8 bis 10: er beinhaltet die komplexen oligomeren Formen von SP-A (**18-mere und höhere multimere Formen**) während der zweite Peak von Fraktion 14 bis 17 ist: **6- bis 12-mere** und der dritte Peak von Fraktion 19 bis 21 stellt hauptsächlich die kleineren Oligomeren Formen von SP-A dar: **Dimere und Trimere** (s. Abb. 3.13). (Orientierung an der Eichung der ÄKTA Säule mit Thyreoglobulin und Blue Dextran s. Methoden 2.2.4)

Bei der Verteilung der oligomeren Formen innerhalb der CF BAL Gruppe ist zu erkennen, dass SP-A vorwiegend im ersten Peak zu finden ist. Folglich lassen sich vorwiegend komplexe höhere Formen von SP-A in der nativen CF BAL eluieren. Der zweite und dritte Peak ist ähnlich groß. Bei der Kontrollgruppe (Bronchitis und Asthma bronchiale BAL) hingegen ist der erste und zweite Peak nahezu gleich groß. Folglich sind in der nativen Kontroll BAL sowohl höhere oligomere Formen als auch 6- bis 12-mere Formen in gleichem Maße zu finden.

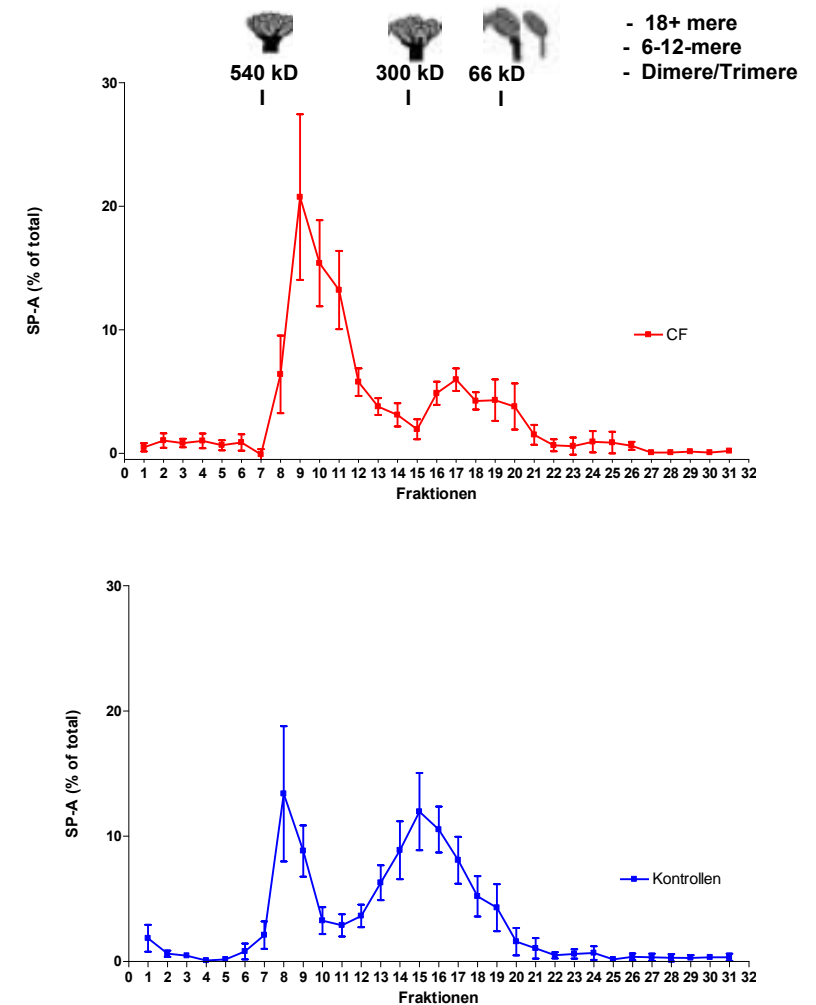
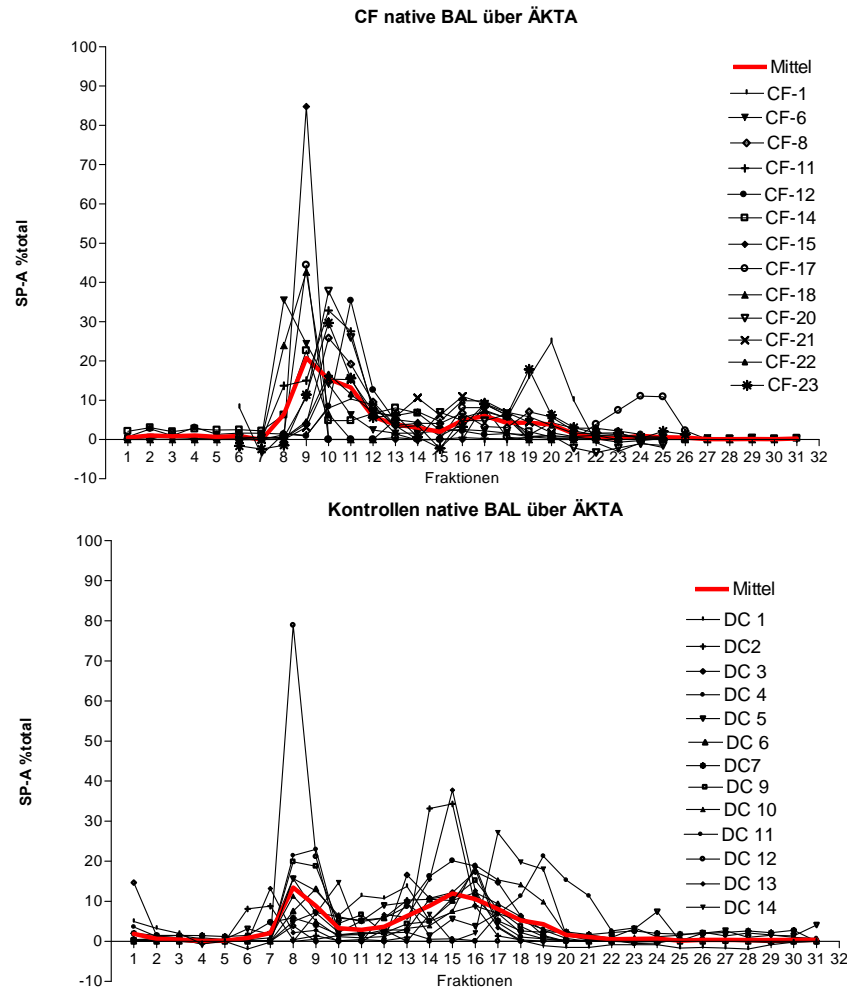


Abb. 3.12: Die SP-A Struktur Verteilung der nativen BAL durch Gelfiltration: CF BAL (links oben) und Kontroll BAL links (unten)

1 ml nativer BAL wurde mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA) aufgetrennt um die Verteilung des SP-A bezüglich des Molekulargewichts darzustellen und dadurch die Oligomeren Formen darzustellen.

Links oben: CF (native BAL über ÄKTA)

rechts oben: CF (native BAL über ÄKTA) Darstellung der Mittelwerte mit SEM

Links unten: Kontrollen (native BAL über ÄKTA)

rechts unten: Kontrollen (native BAL über ÄKTA) Darstellung der Mittelwerte mit SEM

Die rote Kurve stellt den Mittelwert dar.

Folgerungen zu 3.4.1:

- Mittels Gelfiltrationschromatographie der nativen BAL wird SP-A in 3 große Peaks eluiert:
 1. Peak bei Fraktion 8-10: 18-mere und höhere multimere Formen
 2. Peak bei Fraktion 14-17: 6- bis 12-mere Formen
 3. Peak bei Fraktion 19-21: Dimere und Trimere
- Bei der CF BAL ist der erste Peak am größten d.h. SP-A besteht bei der CF BAL vorwiegend aus komplexen höheren Oligomeren. Bei der Kontrollgruppe ist der erste und zweite Peak ähnlich groß.

3.4.2 Affinitätschromatographie ohne Detergenz

In der Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose (s. Methoden 2.2.2) wurde die Kohlenhydratbindungsaffinität von SP-A zu Fucose überprüft. Die Versuche wurden in Abwesenheit von Detergenz (Triton X 100) durchgeführt, um die nativen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Das Detergenz kann möglicherweise die Zusammenlagerung der SP-A Oligomeren zu komplexen Formen beeinflussen. Zur Etablierung der Methode wird auf den Anhang (s. Anhang 6.1.) verwiesen.

Das Ausmaß der Kohlenhydratbindungseigenschaften von SP-A spiegelt die Funktion von SP-A wider. Hierzu ist der Vergleich zwischen der CF- und Kontrollgruppe interessant.

Die bei der Affinitätschromatographie entstandenen Eluate (Flow-through und Calcium-wash 1.-3. Eluate) wurden zu einem Pool 1 zusammengefasst. Pool 1 enthält demnach diejenige Konzentration an SP-A, die an der Fucose-Säule nicht binden konnte („**SP-A non-binding**“). Die weiteren Eluate (EDTA wash 1.-3.) entsprechen derjenigen Konzentration an SP-A, die an der Fucose-Säule binden konnte: diese Eluate wurden zu einem Pool 2 zusammengefasst („**SP-A binding**“). Pool 1 und Pool 2 wurden jeweils im Anschluss über die Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA) aufgetrennt.

Vom besonderen Interesse war es, zu überprüfen, ob die „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen sich bezüglich ihrer komplexen oligomeren Formen unterscheiden.

Analyse der SP-A Struktur von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ bei CF mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA)

Um strukturelle Unterschiede vom nicht-bindenden SP-A aus Pool 1 („**SP-A non-binding**“) im Vergleich zum bindenden SP-A aus Pool 2 („**SP-A binding**“) zu erkennen, wurden Pool 1 und Pool 2 über die Gelfiltrationschromatographie aufgetrennt.

Die Affinitätschromatographie mit der Fucose-Agarose-Säule wurde mit jeweils 1 ml CF BAL (n=4) und 1 ml Kontroll BAL (n=4) durchgeführt. Bei allen Elutionspuffern wurde allerdings kein Detergenz hinzugefügt. Die einzelnen Eluate wurden dann entsprechend zu Pool 1 und Pool 2 zusammengefasst und die SP-A Struktur wurde wieder über die Gelfiltrationschromatographie analysiert (s. Abb. 3.14 und Abb. 3.15).

Hier zeigte sich, dass bei „SP-A non-binding“ der CF-Lavagen, wie auch bei den nativen CF Lavagen, der erste Peak (Fraktion 8-10) am größten ist. Dies bedeutet, dass nicht-funktionsfähiges SP-A bei CF auch komplexe Formen enthält. Bei den Kontrollen zeigte sich bei „SP-A non-binding“, dass der erste und zweite Peak ähnlich groß sind.

Bei beiden Gruppen war die Darstellung des „SP-A binding“ gleich: der Großteil des bindenden SP-A wurde beim ersten Peak bei den Fraktionen 8 bis 10 (entsprechen 18-meren und größere Formen von SP-A) eluiert. Dies deutet darauf hin, dass „SP-A binding“ – funktionsfähiges SP-A – bei beiden Gruppen vorwiegend aus komplexen Oligomeren besteht.

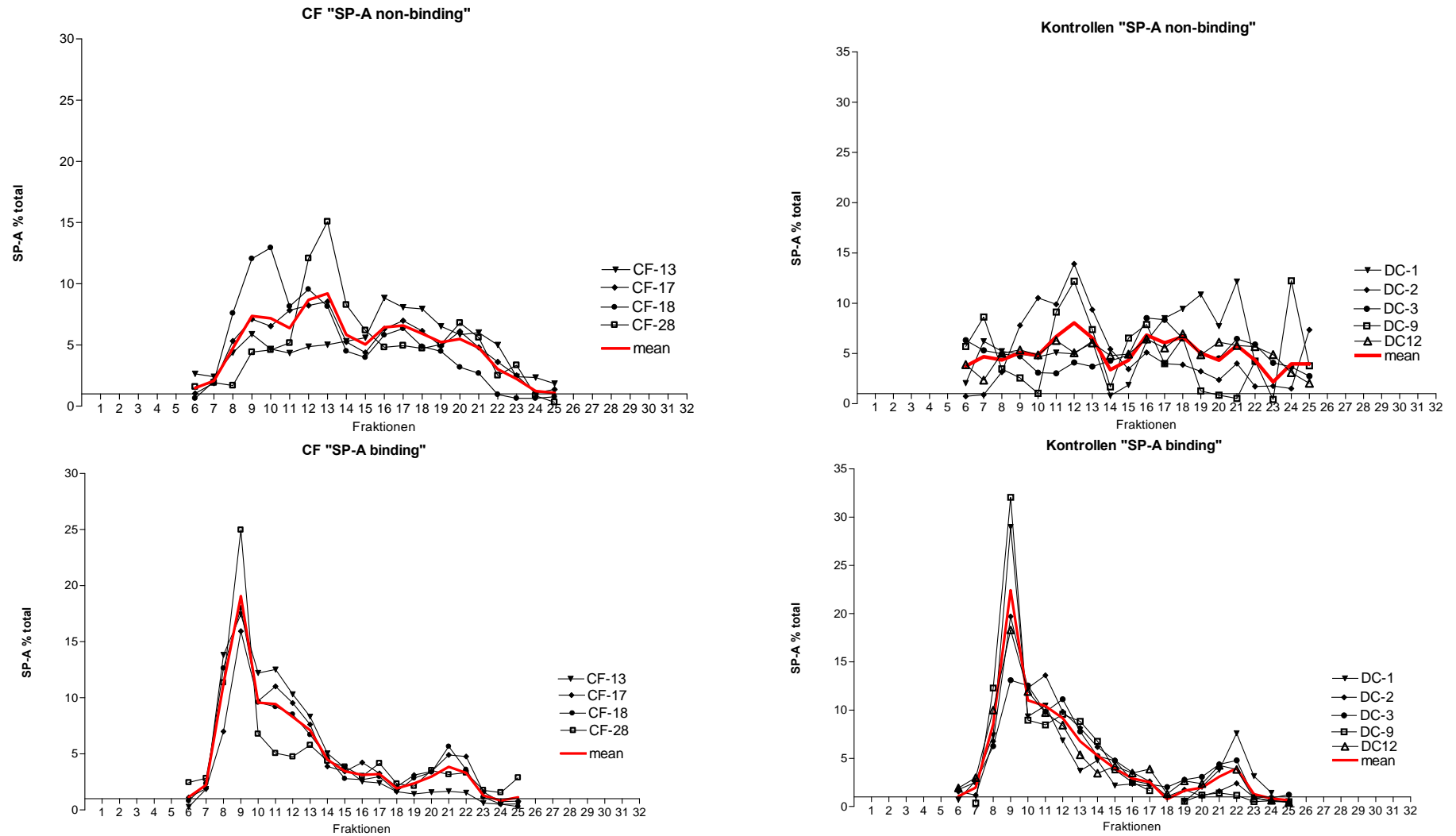


Abb. 3.13: Verteilung der SP-A oligomeren Formen: Unterschiede zwischen „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ bei CF (links) und Kontrollen (rechts)

1 ml nativer BAL (n=4) wurde mittels Fucose Affinitätschromatographie aufgetrennt, dabei enthielt das Elutionspuffer kein Detergenz:

die „SP-A non-binding“ Eluate wurden zu Pool 1 und die „SP-A binding“ Eluate zu Pool 2 zusammengefasst. Anschließend wurden jeweils Pool 1 und Pool 2 einer BAL Probe über die Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA) aufgetrennt um die Verteilung der SP-A oligomeren Formen darzustellen.

Die rote Kurve stellt den Mittelwert dar. **Links:** CF BAL; **rechts:** Kontrollen BAL

Folgerungen zu 3.4.2:

- Mittels Fucose-Affinitätschromatographie lässt sich SP-A in „**SP-A non-binding**“ und „**SP-A binding**“ eluieren. „**SP-A binding**“ entspricht dem funktionsfähigen SP-A.
- Die Makromolekulare Anordnung von „SP-A non-binding“ bei CF zeigt einen großen ersten Peak:
 - Bei CF enthält nicht funktionsfähiges SP-A komplexe Oligomere.
- Die Makromolekulare Anordnung von „SP-A binding“ unterscheidet sich bei beiden Gruppen nicht.

3.5 Makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) in der CF und Kontroll BAL im Vergleich: Versuche mit Detergenz

3.5.1 Fucose-Agarose Affinitätschromatographie bei bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit cystischer Fibrose (Versuche mit Detergenz)

Bei 27 Patienten mit Mukoviszidose wurde die Bindungsaffinität von Surfactant Protein A aus der bronchoalveolären Lavage zu Fucose untersucht. Von jeder Probe wurden 100-200 µl BAL zunächst entsalzen und anschließend in Kalziumpuffer gelöst auf die Fucose-Säule geladen. Die Affinitätschromatographie wurde nach Schema durchgeführt (s. Methoden 2.2.2 und Etablierung der Methode im Anhang 6.7). Anschließend wurden die einzelnen Eluate mittels 1D-Gelelektrophorese unter denaturierten und reduzierten Bedingungen aufgetrennt und im Immunoblot wurde das SP-A detektiert. Als Positivkontrolle wurden 10 µl BAL derselben Probe, die nicht über die Fucosesäule aufgetrennt wurden, aufgetragen. Als SP-A Standard wurde rhSP-A (BYK, Gulden) verwendet.

Bei allen Elutionspuffern der Affinitätschromatographie wurde zur besseren Darstellung in der 1 D Electrophorese Detergenz (Triton X 100) hinzugefügt.

Die Fraktion *Flow through* und die 1.-3. *Calcium-wash* Eluate wurden als „**SP-A non-binding**“ zusammengefasst, sie enthalten das SP-A Volumen, das nicht an Fucose binden konnte. Die 1.-3. *EDTA-wash* Fraktionen enthalten das SP-A Volumen, das kalziumabhängig an Fucose binden konnte, folglich wurden diese Fraktionen zusammengefasst als „**SP-A binding**“ bezeichnet.

In Abb.3.24 ist ein Beispiel für die Affinitätschromatographie mit der BAL eines CF-Patienten (Probe CF-15) aufgeführt, Immunoblot und Silberfärbung des 1D-Gels sind im Vergleich dargestellt. In der Silberfärbung werden alle Proteinkomponenten der Lavage dargestellt, deshalb sind in der *Flow through*- und der *1. Calcium wash* Fraktion zahlreiche Banden zu sehen. Diese Banden entsprechen Proteinen, die an Fucose nicht binden konnten d.h. sie sind durch die Säule durchgeflossen. In den *EDTA-wash* Fraktionen der Silberfärbung stellen sich Banden dar, die auch im Immunoblot zu sehen sind. Bei diesen Banden handelt es sich um SP-A Proteine, die an Fucose binden konnten.

Anhand des Immunoblots wurde semiquantitativ der Anteil des nicht gebundenen und des gebundenen SP- A vom SP-A Gesamtvolumen, das auf die Säule geladen wurde, bestimmt. In dem Beispiel konnten **39,4 %** vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose binden (***SP-A binding***) und **60,4 %** vom SP-A Gesamtvolumen konnten hingegen nicht binden (***SP-A non-binding***).

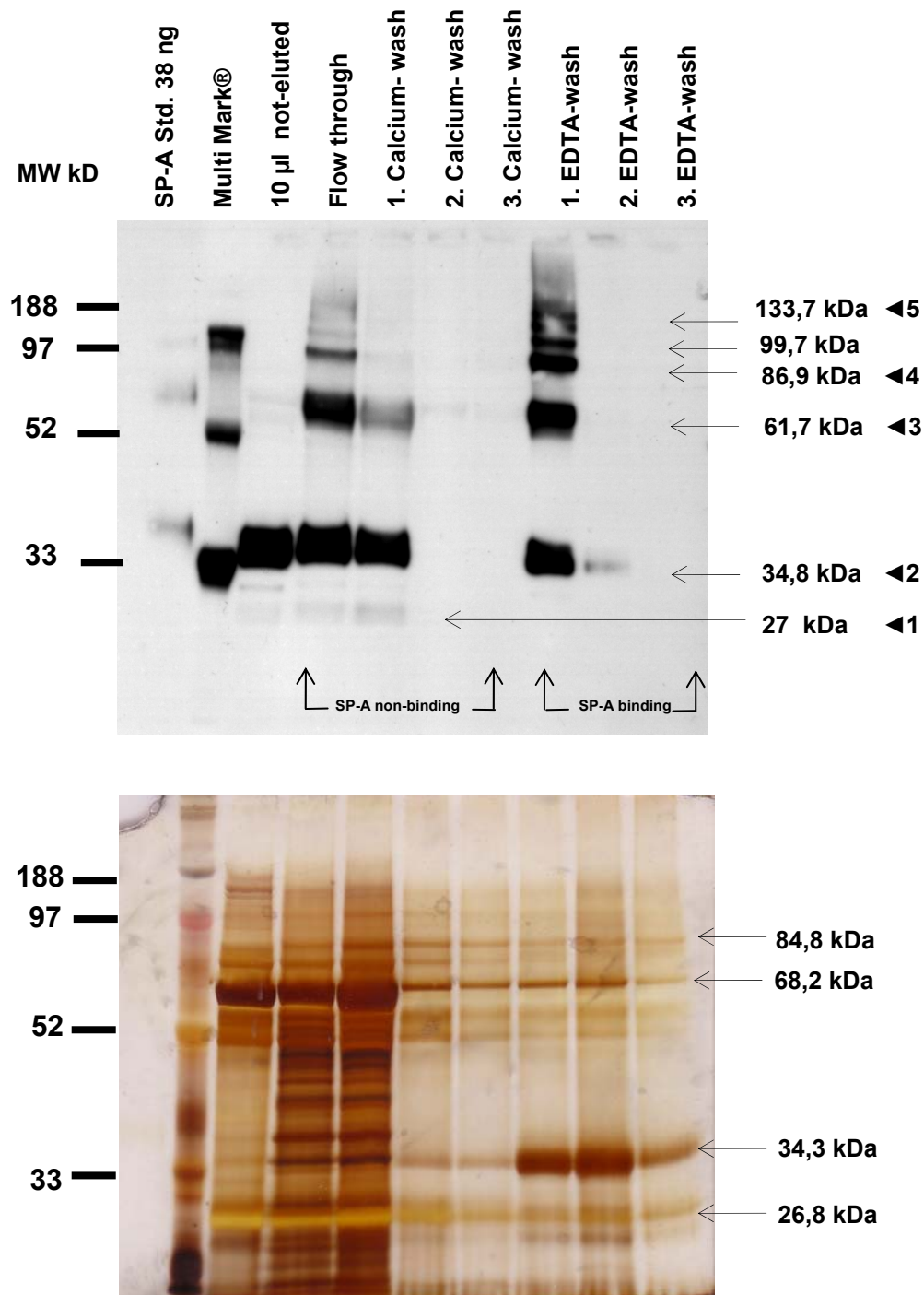


Abb. 3.24: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert nach Fucose-Affinitätschromatographie. Immunoblotting (oben) und Silberfärbung (unten).

Fucose Säulenchromatographie der Probe CF-15, SP-A Konzentration der BAL: 2148 ng/ml, Gesamtprotein: 477,5 µg/ml. 100 µl aus dem Pool der BAL wurden mit 900 µl Calciumpuffer auf die Fucose-Säule geladen. Als SP-A Standard wurden 38 ng rhSP-A (Byk, Gulden) verwendet. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Die Flow-through und 1.-3. Calcium-wash Fraktionen werden zusammengefasst als **SP-A non-binding** und die 1.-3. EDTA-wash Fraktionen als **SP-A binding**. Im Immunoblot enthält die **SP-A non-binding** Fraktion 60,38 % des SP-A Gesamtvolumens, die **SP-A binding** Fraktion hingegen 39,62 %.

Legende: ◀1: SP-A Fragment?, ◀2: SP-A Monomer, ◀3: Dimer, ◀4: Trimer, ◀5: Tetramer

Im Immunoblot ließ sich Surfactant Protein A bei 34,8 kDa (**Monomer**), 61,7 kDa (**Dimer**), 86,9 kDa (**Trimer**) und 133,7 kDa (**Tetramer**) detektieren. In der Flow through und 1. Calcium-wash Fraktion zeigten sich schwache Banden bei 27 kDa, hier könnte es sich möglicherweise um SP-A Fragmente handeln.

In Abb. 3.25 ist die makromolekulare Zusammensetzung von SP-A in den „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen dargestellt: zu erkennen ist, dass in absteigender Reihenfolge Monomere, Dimere, Trimere, Tetramere und Fragmente im Immunoblot detektiert werden konnten.

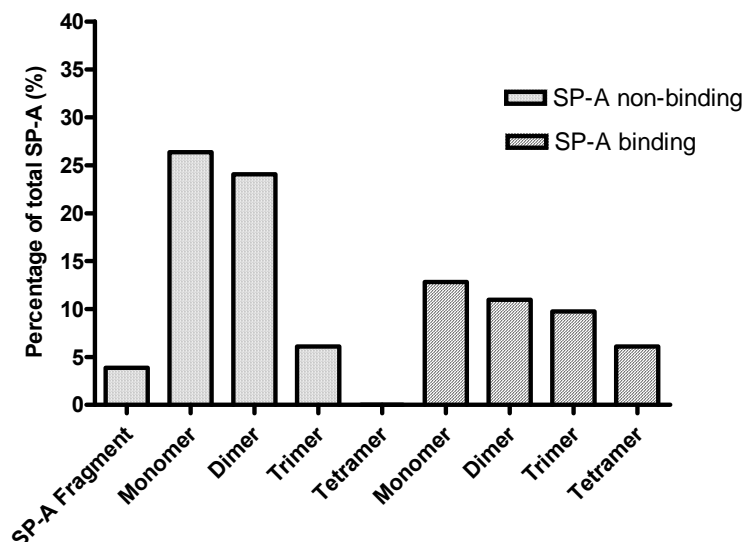


Abb. 3.25: Verteilung der makromolekularen Zusammensetzung von SP-A in den „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen der Probe CF-15. Angaben in % bezogen auf die Gesamtkonzentration von SP-A.

In Abb. 3.26 sind die einzelnen Fraktionen der Affinitätschromatographie mit Fucose von 24 der 27 untersuchten Patienten mit cystischer Fibrose beispielhaft dargestellt. Die Immunoblotanalysen der Flow through Fraktionen und der 1.-3- Calcium-wash Fraktionen wurden miteinander verglichen. Es konnten vorwiegend SP-A Monomere, Dimere und Trimere vereinzelt auch Tetramere dargestellt werden. Bei den Proben CF-12 und CF-16 konnten Banden mit sehr niedrigem Molekulargewicht detektiert werden (mit Pfeil markiert): 26-27 kDa.

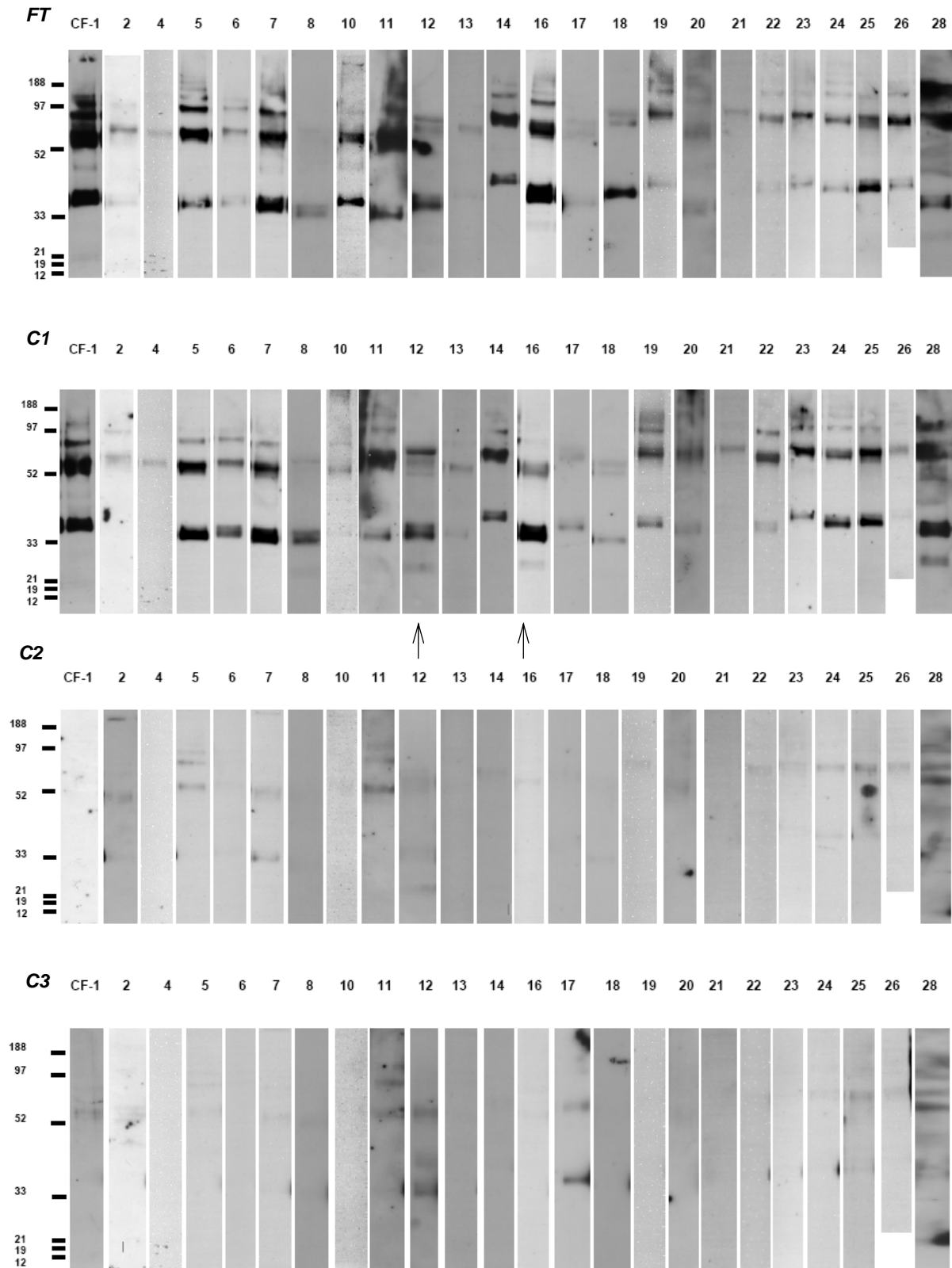
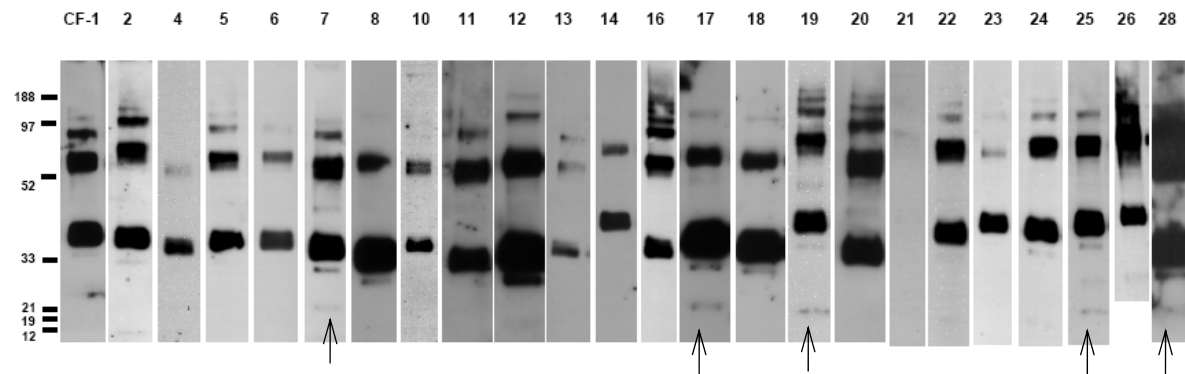


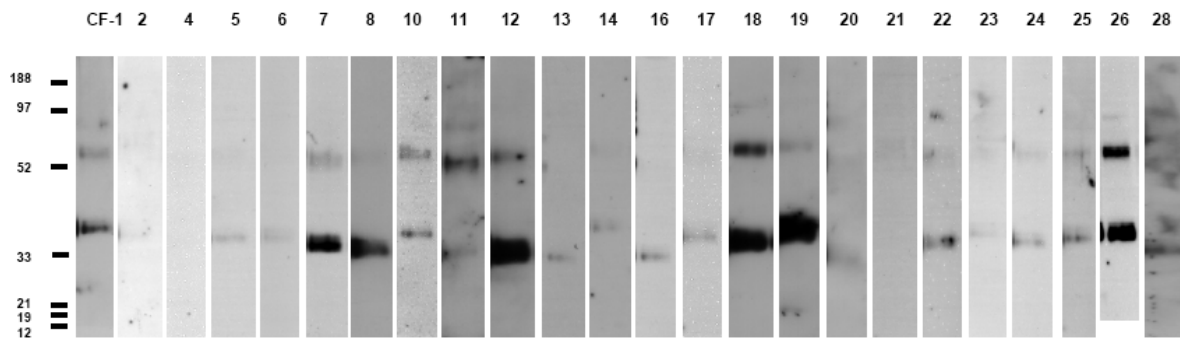
Abb. 3.26: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblotanalysen der *Flow through* (FT), 1.-3.- *Calcium-wash* Fraktionen (C1, C2 und C3) von 24 der 27 untersuchten Patienten mit cystischer Fibrose im Vergleich.

Bei C1 sind Banden bei sehr niedrigem Molekulargewicht zu sehen (markiert mit einem Pfeil): CF-12: 26 kDa; CF-16: 27 kDa

E1



E2



E3

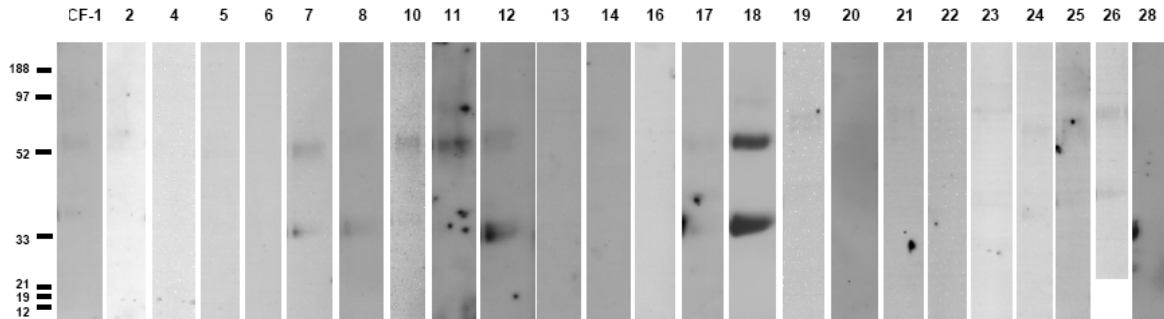


Abb. 3.27: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblotanalysen der 1.-3.- EDTA-wash Fraktionen (E1, E2 und E3) von 24 der 27 untersuchten Patienten mit cystischer Fibrose im Vergleich.

Bei E1 sind Banden bei sehr niedrigem Molekulargewicht zu sehen (markiert mit einem Pfeil): CF-7: 23 kDa; CF-17: 18,3 kDa; CF-19: 16 kDa, CF-25: 16,94 kDa und 27 kDa; CF -28: 26,3 kDa

Beim Vergleich der einzelnen Fraktionen fällt mit bloßem Auge auf, dass sich die meisten Banden in der „Flow through“ und „1. Calcium-wash“ Fraktionen sowie in der „1. und 2. EDTA-wash“ Fraktionen detektieren lassen: folglich wird bei den Lavagen der CF Patienten nicht das gesamte Surfactant Protein A gebunden.

Das Bandenvolumen der im Immunoblot detektierten SP-A Banden wurde mit Hilfe des Programms QuantityOne ausgewertet. Das SP-A Volumen wurde dann als Prozentangabe bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen angegeben, das auf die Säule

Bei den insgesamt 27 untersuchten CF BAL Proben wurden im Durchschnitt 52,15 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose nicht gebunden (*SP-A non-binding*), hingegen wurden 47,85 % an Fucose gebunden (*SP-A binding*) (s. Tabelle 3.10).

<i>CF Patienten Gesamtgruppe</i>	
SP-A non-binding	52,15 (33,73; 59,12) [19,19-73,49] 27
SP-A binding	47,85 (40,88; 66,27) [26,51-80,81] 27

Tabelle 3.10: Darstellung des SP-A Volumens als Prozentangabe bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen. Auswertung der Bandenvolumina mit dem Programm QuantityOne.

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

Der Vergleich der Mediane beider Fraktionen ergab keinen signifikanten Unterschied. Hier wurde der Mann-Whitney-Test angewendet ($p=0,2327$) (s. Abb. 3.28).

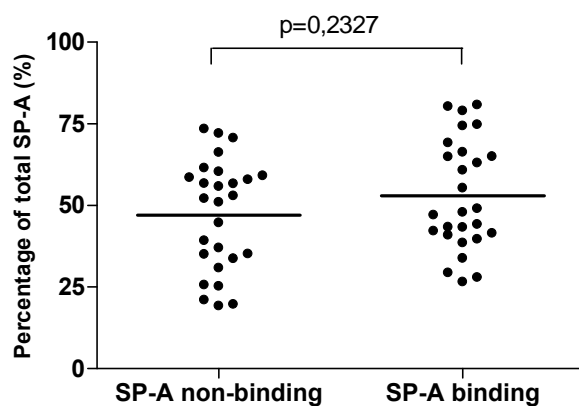


Abb. 3.28: Darstellung der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktion der CF-BAL als Prozentangabe bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen. Symbole entsprechen der einzelnen CF SP-A non-binding bzw. -binding Werte der einzelnen CF BAL Proben. Dargestellt sind die Median Werte.

Als nächstes wurde die makromolekulare Zusammensetzung von SP-A näher angeschaut. Es wurde diesbezüglich die „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen im Vergleich dargestellt (Tabelle 3.11).

SP-A	SP-A non-binding	SP-A binding	p-Wert
Fragmente	15,26 (3,66-18,53) [3,44; 19,81] 5	1,77 (1,34; 2,05) [0,91-2,32] 4	0,0159 *
Monomere	17,62 (11,45; 21,88) [7,65-27,83] 24	27,26 (21,78; 38,54) [12,81-65,57] 26	<0,0001 *
Dimere	21,04 (17,32; 26,00) [7,20-70,64] 27	17,43 (11,93; 24,46) [5,28-32,62] 17	0,0571
Trimere	8,23 (5,96; 11,33) [2,60-18,92] 18	6,27 (3,40; 7,77) [3,03-9,74] 19	0,0347 *
Tetramere	5,76 (2,28; 7,96) [1,92-8,13] 6	2,47 (1,92; 5,27) [1,82-6,09] 5	0,1775

Tabelle 3.11: Darstellung der SP-A Monomere und Multimere der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen im Vergleich. Angaben als Prozent bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen. Auswertung der Bandenvolumina der Immunoblots durch das Programm QuantityOne.

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

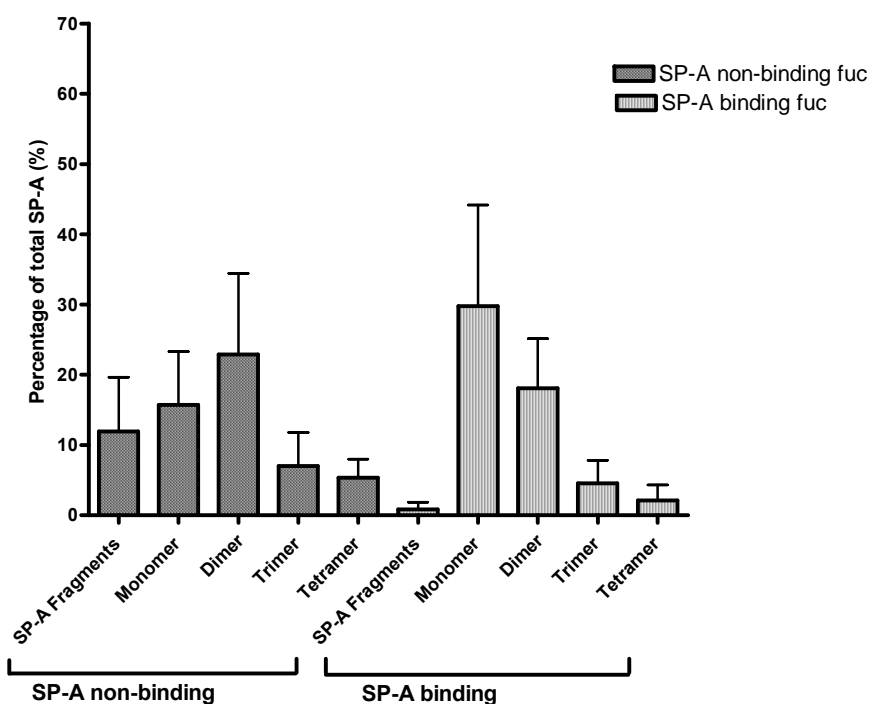


Abb. 3.29: Verteilung der makromolekularen Zusammensetzung von SP-A in den „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen der untersuchten CF-Proben. Angaben in % bezogen auf die Gesamtkonzentration von SP-A. Angegeben sind die Median Werte und die Standardabweichung.

Bei 5 von den 27 untersuchten CF BAL Proben wurden Banden mit sehr niedrigem Molekulargewicht (16,94-26,99 kDa) detektiert. Bei diesen Banden handelt es sich möglicherweise um SP-A Fragmente. Absolut betrachtet hat derjenige Anteil an SP-A Fragmenten aus der „SP-A non-binding“ Gruppe einen wesentlichen Anteil am SP-A Gesamtvolumen mit 15,26 % im Gegensatz zu „SP-A binding“ Anteil mit 1,77 %, somit liegt ein signifikanter Unterschied vor ($p=0,0159$) vor.

Betrachtet man die Verteilung der SP-A Oligomeren in beiden Gruppen, so lässt sich bereits mit bloßem Auge feststellen, dass Unterschiede vorliegen (s. Abb. 3.29). In der „SP-A binding“ Gruppe sind in folgender Reihenfolge die Oligomere verteilt: Monomere, Dimere, Trimere, Tetramere und Fragmente. In der „SP-A non-binding“ Gruppe sind am häufigsten Dimere, Monomere und SP-A Fragmente zu finden.

Der Vergleich der Mediane der Fragmente, Monomere und Trimere der „SP-A non-binding“ und der „SP-A binding“ Gruppe ergaben signifikante Unterschiede (s. Tabelle 3.11).

Folgerungen zu 3.5.1:

- 27 BAL Proben der CF Gruppe wurden mittels Fucose-Affinitätschromatographie untersucht:
im Durchschnitt konnten ca. **52 %** vom Gesamt SP-A an Fucose nicht binden („**SP-A non-binding**“) und
ca. **48 %** Gesamt SP-A konnten an Fucose binden („**SP-A binding**“).
- Die makromolekulare Anordnung von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ dargestellt in der 1 D Gelelektrophorese bei der CF Gruppe zeigt signifikante Unterschiede:
 - „**SP-A non-binding**“ lag zu 17 % als Mono-, zu 21 % als Di-, zu 8 % als Tri- und zu 5,8 % als Tetramer vor. Es lag ein signifikant höherer Anteil an niedermolekularem SP-A mit 15,3 % (SP-A Fragmente).
 - „**SP-A binding**“ lag zu 27 % als Mono-, zu 17 % als Di-, zu 6 % als Tri- und zu 2,5 % als Tetramer vor. SP-A Fragmente kamen zu 1,8 % vor.

3.5.2 Fucose-Agarose Affinitätschromatographie bei bronchoalveolären Lavagen der Kontrollgruppe (Versuche mit Detergenz)

Bei 10 von 14 Proben aus der Kontrollgruppe (rezidivierende Bronchitis und Asthma bronchiale) wurden die Surfactant Proteine A aus der Bronchoalveolären Lavage mittels Säulenchromatographie mit Fucose nach derselben Vorgehensweise, wie in 3.5 untersucht.

Als Beispiel wurden von der Probe DC-5 Immunoblot und Silberfärbung des 1D-Gels im Vergleich dargestellt (Abb. 3.30). Bei dieser Probe lässt sich bereits mit dem bloßen Auge auf dem Immunoblot erkennen, dass das meiste SP-A Volumen in den „EDTA-wash“ Fraktionen eluiert werden konnte. In diesem Fall wurden 94 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose gebunden („SP-A binding“) und 6 % vom SP-A Gesamtvolumen konnten hingegen nicht binden („SP-A non-binding“).

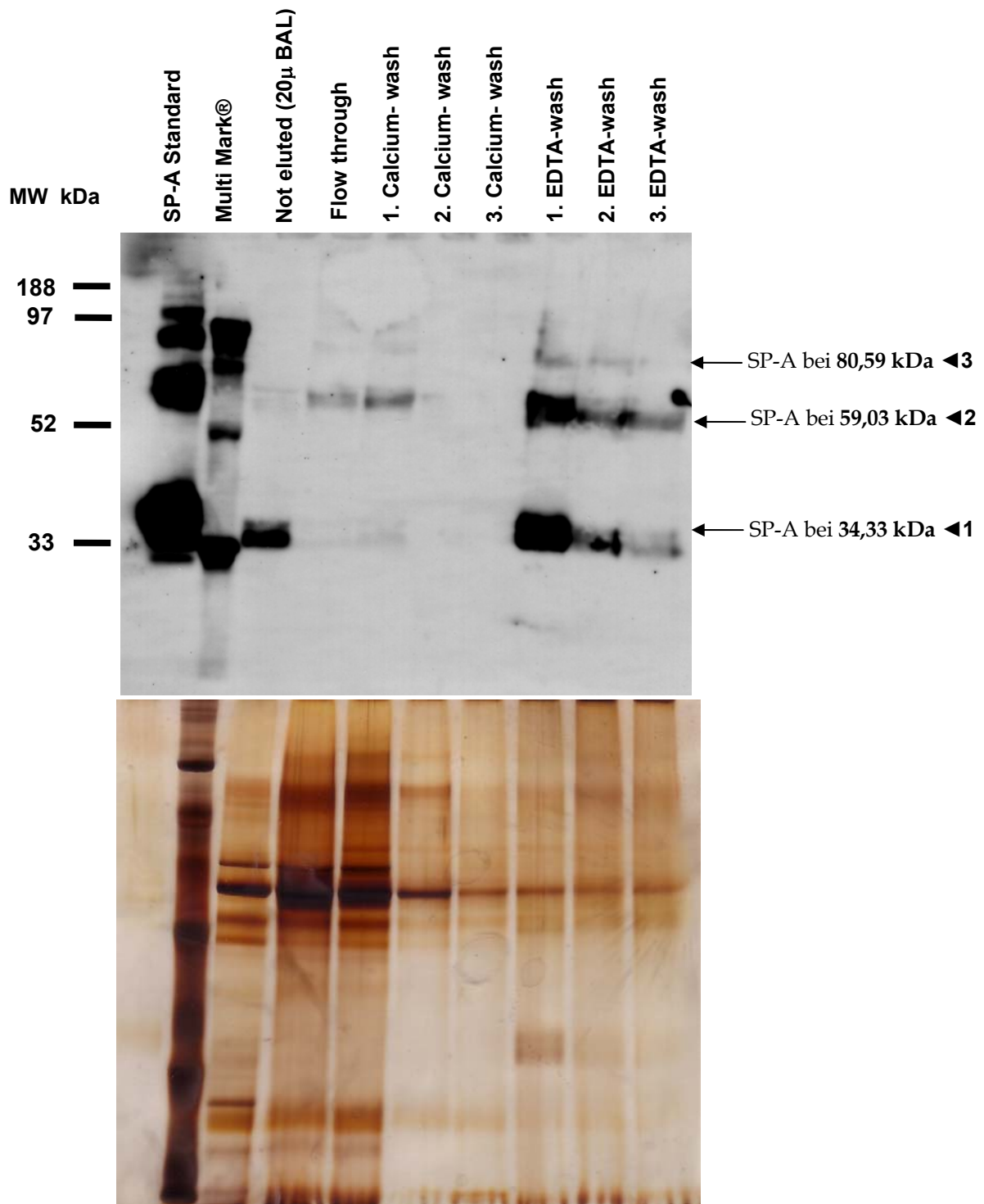


Abb. 3.30: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert mit Immunoblotting (oben) und Silberfärbung (unten).

Fucose Säulenchromatographie der Probe DC-5, SP-A Konzentration der BAL: 1779 ng/ml.

200 μ l aus dem Pool der BAL wurden entsalzen und anschließend gelöst in 1 ml Calciumpuffer auf die Fucosesäule geladen (Es entspricht einer SP-A Konzentration von 355,8 ng/1 ml Calciumpuffer). Als Standard wurden 66 ng humanes rekombinantes SP-A von Byk, Gulden verwendet. Im Immunoblot enthält die SP-A non-binding Fraktion 6,00 % des SP-A Gesamtvolumens, die SP-A binding Fraktion hingegen 94,00 %.

Legende: \blacktriangleleft 1: SP-A Monomer, \blacktriangleleft 2: Dimer, \blacktriangleleft 3: Trimer.

In den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 3.31-3.37) sind die Immunoblots der 10 untersuchten Lavagen aus der Kontrollgruppe (Disease Control, DC) nebeneinander dargestellt. Dabei wurden jeweils die Fraktionen aus der Säulenchromatographie mit Fucose (Flow through, 1.-3. Calcium-wash und 1.-3. EDTA-wash Fraktionen) der einzelnen Kontrollen miteinander verglichen.

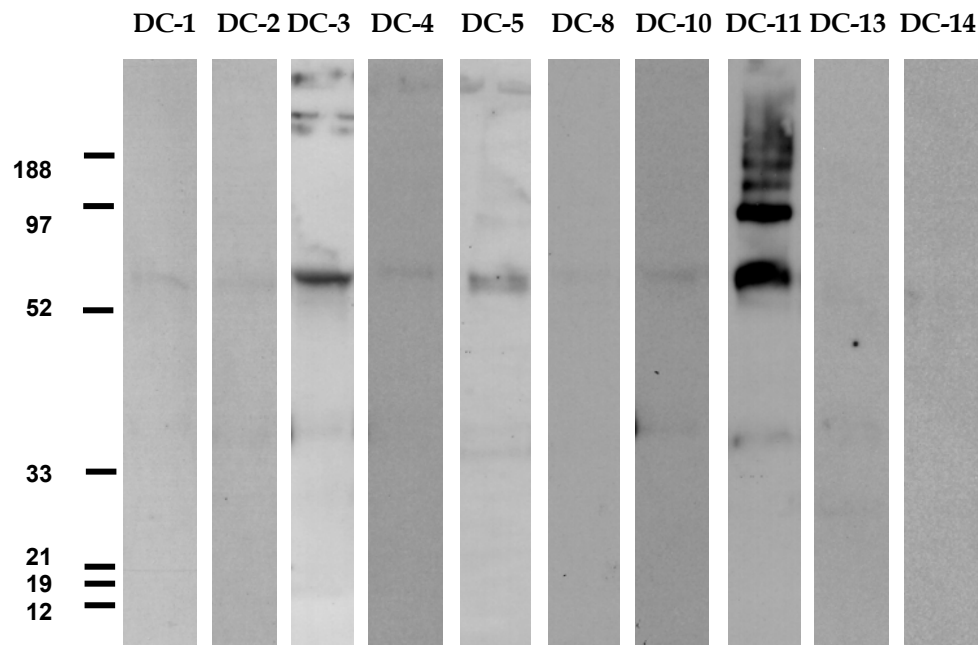


Abb. 3.31: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „Flow through“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

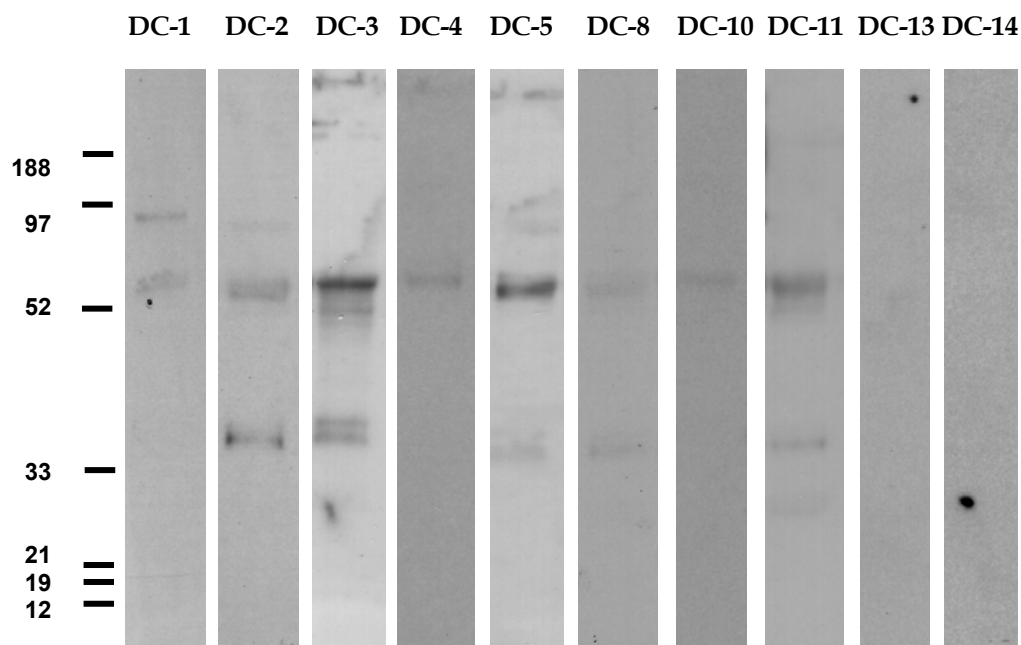


Abb. 3.32: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „1. Calcium-wash“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

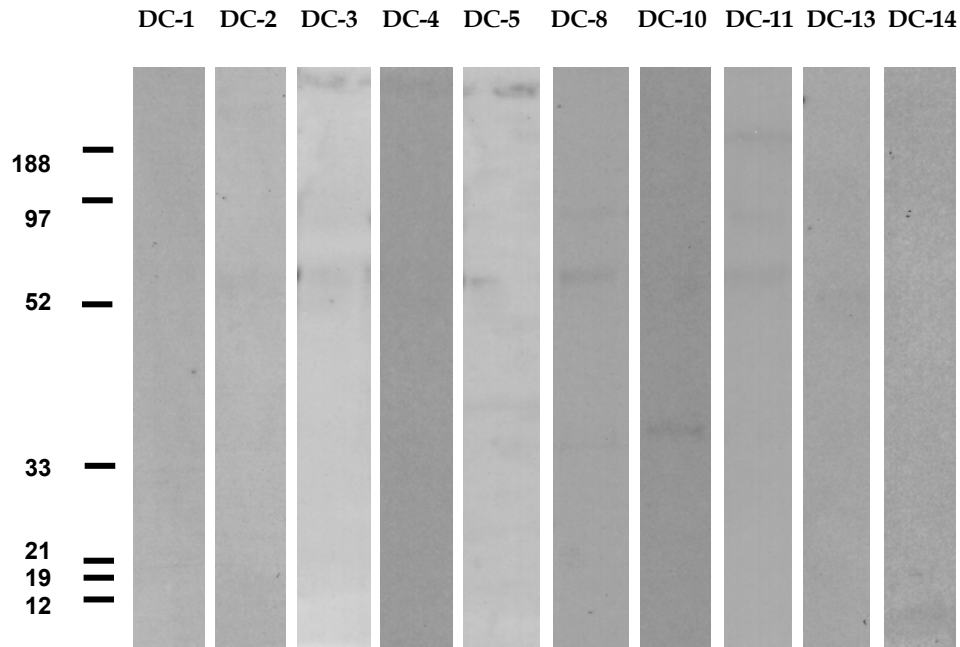


Abb. 3.33: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „2. Calcium-wash“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

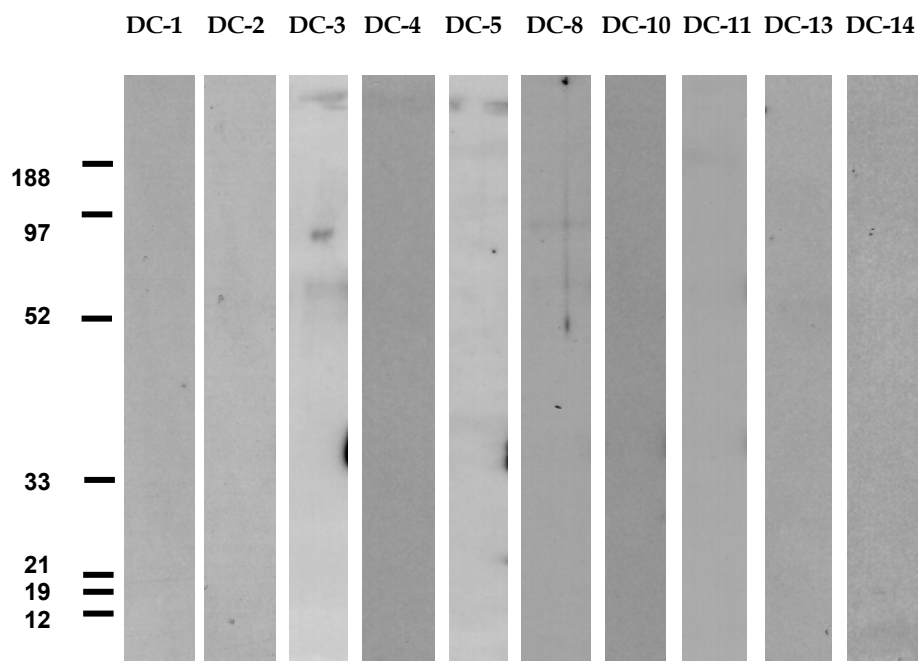


Abb. 3.34: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „3. Calcium-wash“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

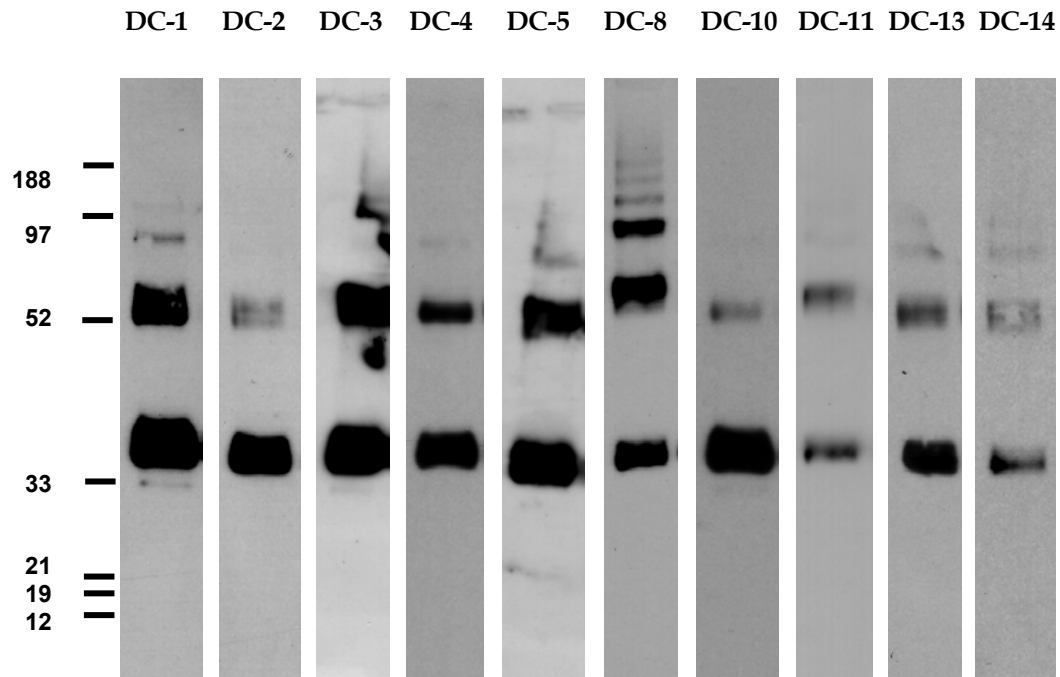


Abb. 3.35: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „1. EDTA-wash“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

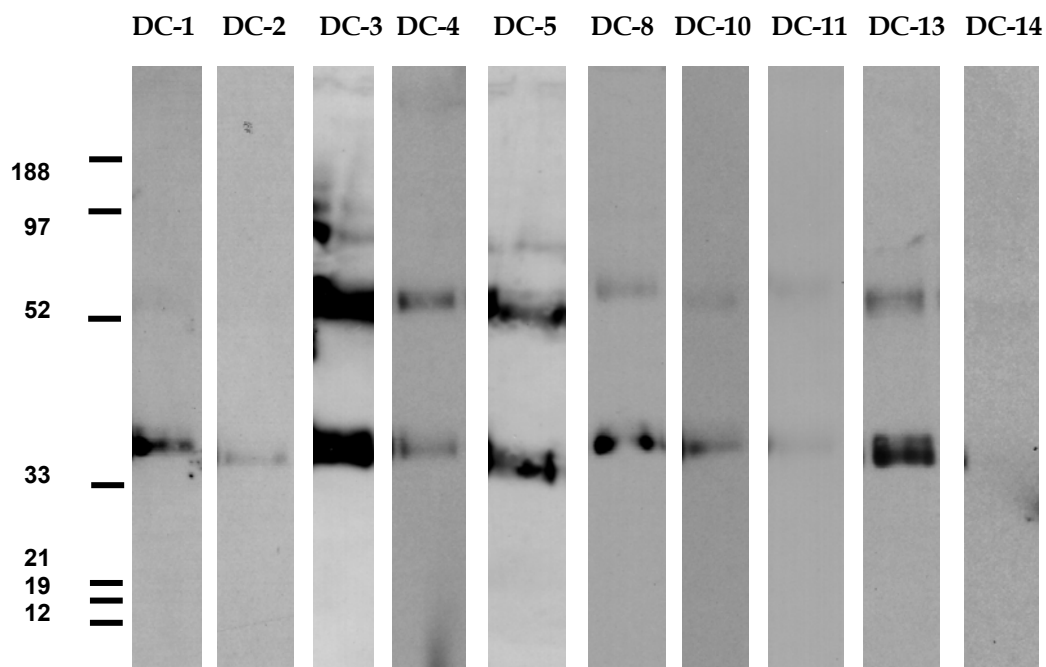


Abb. 3.36: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „2. EDTA-wash“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

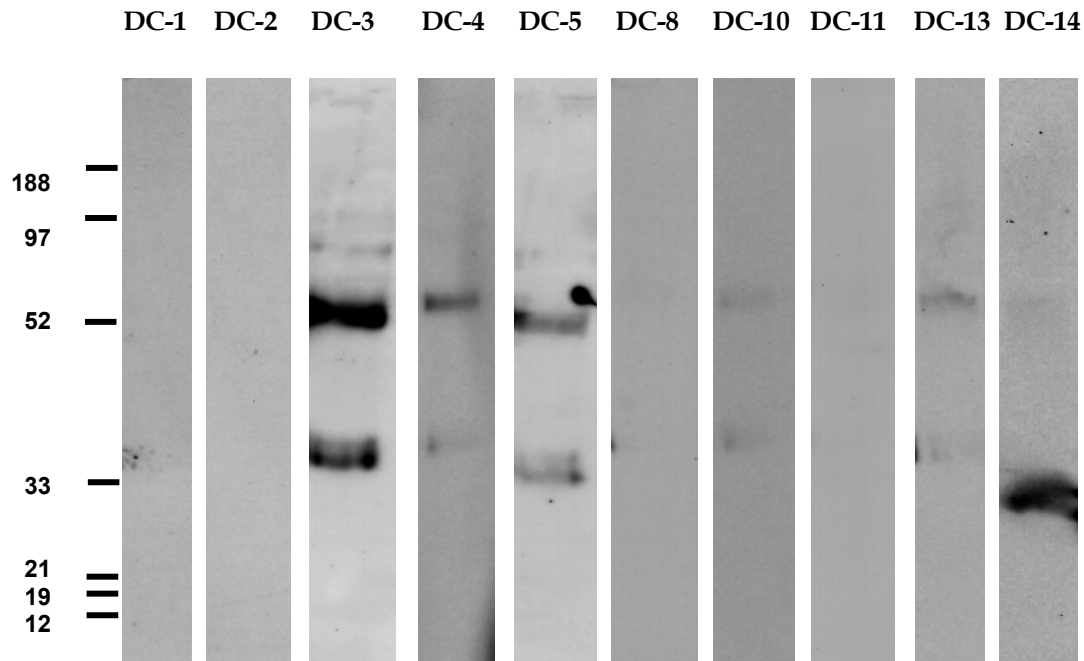


Abb. 3.37: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert. Immunoblots der „3. EDTA-wash“ Fraktionen der 10 Disease Control Proben im Vergleich.

Bei den insgesamt 10 untersuchten Kontroll-Lavagen wurden im Durchschnitt 8,31 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose nicht gebunden (*SP-A non-binding*), hingegen wurden 91,70 % an Fucose gebunden (*SP-A binding*).

	<i>Disease Control Gruppe</i>
SP-A non-binding	8,31 (5,36; 16,46) [0-61,42] 10
SP-A binding	91,70 (83,54; 94,64) [38,58-100] 10

Tabelle 3.12: Darstellung des SP-A Volumens als Prozentangabe bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen. Auswertung der Bandenvolumina mit dem Programm QuantityOne.

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

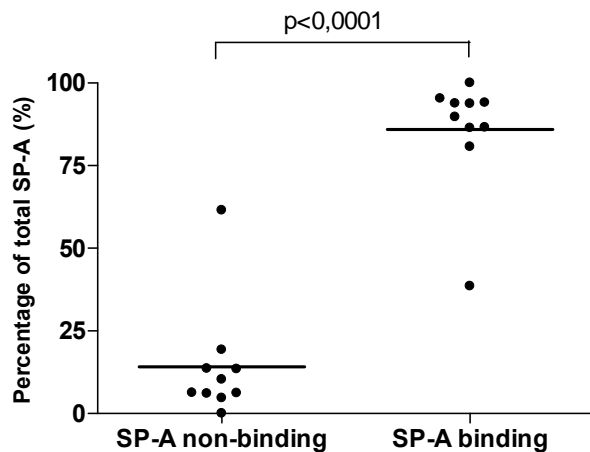


Abb. 3.38: Darstellung der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktion der Kontroll BAL als Prozentangabe bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen. Symbole entsprechen der einzelnen SP-A non-binding bzw. -binding Werte der einzelnen Kontroll BAL Proben. Dargestellt sind die Median Werte.

Der Vergleich der Mediane beider Fraktionen ergab einen signifikanten Unterschied. Hier wurde der Mann-Whitney-Test angewendet ($p > 0,0001$) (s. Abb. 3.38).

Als nächstes wurde die makromolekulare Anordnung von SP-A näher angeschaut. Es wurde diesbezüglich die „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen im Vergleich dargestellt (Tabelle 3.13).

<i>SP-A</i>	<i>SP-A non-binding</i>	<i>SP-A binding</i>	<i>p-Wert</i>
Fragmente	-	-	
Monomere	6,49 (2,36; 11,23) [0-13,47] 6	49,03 (33,88; 61,45) [19,18-69,23] 10	0,0002 *
Dimere	6,88 (6,00; 10,98) [4,43-25,11] 7	35,30 (23,02;38,47) [11,49-40,78] 10	0,0004 *
Trimere	2,21 (0,95; 10,07) [0-17,60] 4	6,31 (4,61; 14,20) [3,06-16,73] 7	0,2303 *
Tetramere	9,74 [9,74-9,74] 1	4,13 (2,12; 8,63) [1,72-11,52] 4	0,2376

Tabelle 3.13: Darstellung des SP-A Volumens als Prozentangabe bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen. Auswertung der Bandenvolumina mit dem Programm QuantityOne.

Bei den Zahlenangaben handelt es sich um folgende Werte:

Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

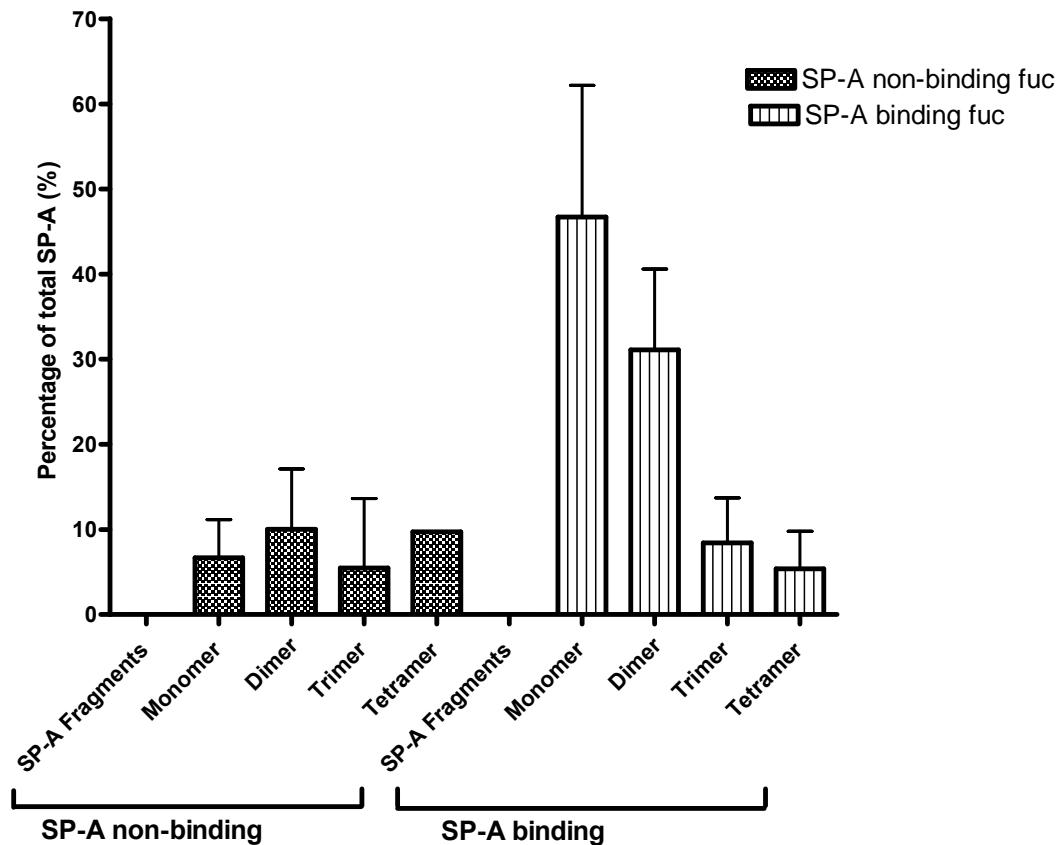


Abb. 3.43: Verteilung der makromolekularen Zusammensetzung von SP-A in der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen der untersuchten Kontroll BAL Proben. Angaben in % bezogen auf die Gesamtkonzentration von SP-A. Angegeben sind Mediane und Standardabweichung.

Bei der Betrachtung der makromolekularen Anordnung des SP-A aus den Kontroll Lavagen fällt auf, dass im Gegensatz zu den CF Lavagen bei allen untersuchten Kontroll Proben keine SP-A Fragmente auftreten. Ansonsten ist die Aufteilung der SP-A Oligomeren der Kontrollgruppe ähnlich wie der CF Gruppe.

Die Verteilung von Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren in der „SP-A binding“ Gruppe ist relativ ähnlich wie in der CF Gruppe: der Reihenfolge nach lassen sich Mono-, Di-, Tri- und Tetramere darstellen. In der „SP-A non-binding“ Gruppe der Kontrollen ist die Aufteilung ebenfalls ähnlich wie in der CF Gruppe: hier lassen sich auch vorwiegend Dimere gefolgt von Mono-, Tri- und Tetrameren darstellen.

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil an Mono-, Di- und Trimeren in der „SP-A non-binding“ und in der „SP-A binding“ Gruppe innerhalb der Kontroll BAL. Das lässt sich damit erklären, dass der größte SP-A Anteil an Fucose bindet und deshalb in den EDTA Fraktionen (SP-A binding Fraktionen) zu finden ist.

Als nächstes wurden die SP-A Volumina der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen der Cystischen Fibrose Patientengruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Es konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich einer höheren „SP-A non-binding“ Fraktion und einer niedrigen „SP-A binding“ Fraktion in der CF Gruppe festgestellt werden. Die Medianwerte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen (jeweils $p=0,0001$). Alle Fraktionen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test miteinander verglichen ($p<0,0001$).

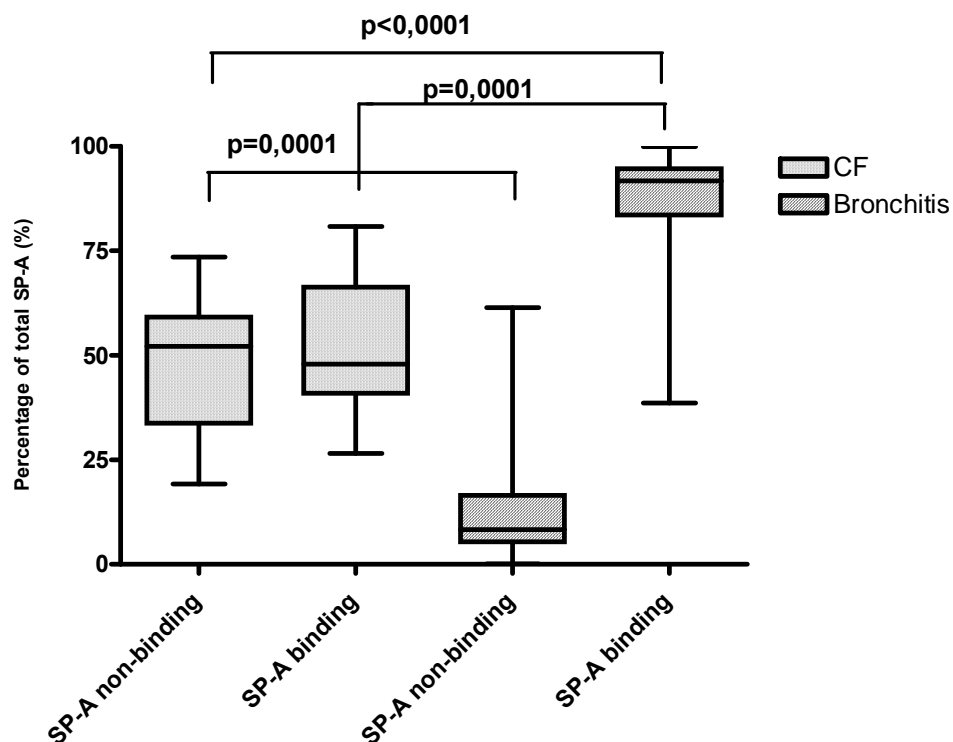


Abb. 3.44: Vergleich der SP-A Volumina der „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen der Cystischen Fibrose Gruppe (CF) und Disease Control Gruppe (DC). Angaben in % bezogen auf das SP-A Gesamtvolumen, das auf die Fucose-Säule geladen wurde. Werte durch Bandenauswertung der Immunoblots mit QuantityOne.

Dargestellt sind: Median, 25% Perzentile und 75% Perzentile, Minimal- und Maximalwert.

3.6 Einfluss von DNA auf die Bindungseigenschaften von SP-A in der BAL

3.6.1 Gelfiltrationschromatographie nativer BAL nach Inkubation mit DNase

Es ist bekannt, dass in der CF Lunge durch eine chronische Inflamationsreaktion viel freie DNA vorhanden ist. In bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit cystischer Fibrose beträgt die durchschnittliche DNA Konzentration $17,6 \pm 11,2 \mu\text{g/ml}$ (Ratjen et al. 2005).

Es ist bekannt, dass SP-A über die CRD-Region freie und über apoptotische Zellen präsentierte DNA bindet. Diese DNA Bindungen können dazu führen, dass große SP-A Aggregate entstehen.

Diese Überlegung führte dazu zu überprüfen:

1. Ob nach Inkubation der CF BAL mit DNase sich die SP-A Struktur Verteilung über die Gelfiltrationschromatographie verändert: sprich, ob der erste Peak kleiner wird.
2. Wie hoch die DNA Konzentration in der CF BAL ist.

zu 1.:

Die nativen bronchoalveolären Lavagen von CF (n=3) und Kontrollen (n=3) (jeweils 1 ml) wurden mit DNase (Deoxyribonuclease I, Sigma-Aldrich) bei 37°C für 10 min inkubiert (s. Methoden 2.2.7) und anschließend wurde nach gewohntem Schema die Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. In Abb. 3.45 ist die Verteilung der SP-A oligomeren Formen von beiden Gruppen dargestellt. Zum besseren Überblick wurden die nativen Lavagen dieser Proben also ohne DNase Inkubation (jeweils blaue Kurven) in der jeweiligen Graphik dargestellt. Bereits mit dem bloßen Auge fällt auf, dass nach Inkubation mit DNase der erste peak bei F8/F9 deutlich zunimmt, d.h. nach Inkubation mit DNase können mehr komplexe oligomere Formen der BAL sowohl bei CF- als auch bei den Kontroll-Proben dargestellt werden.

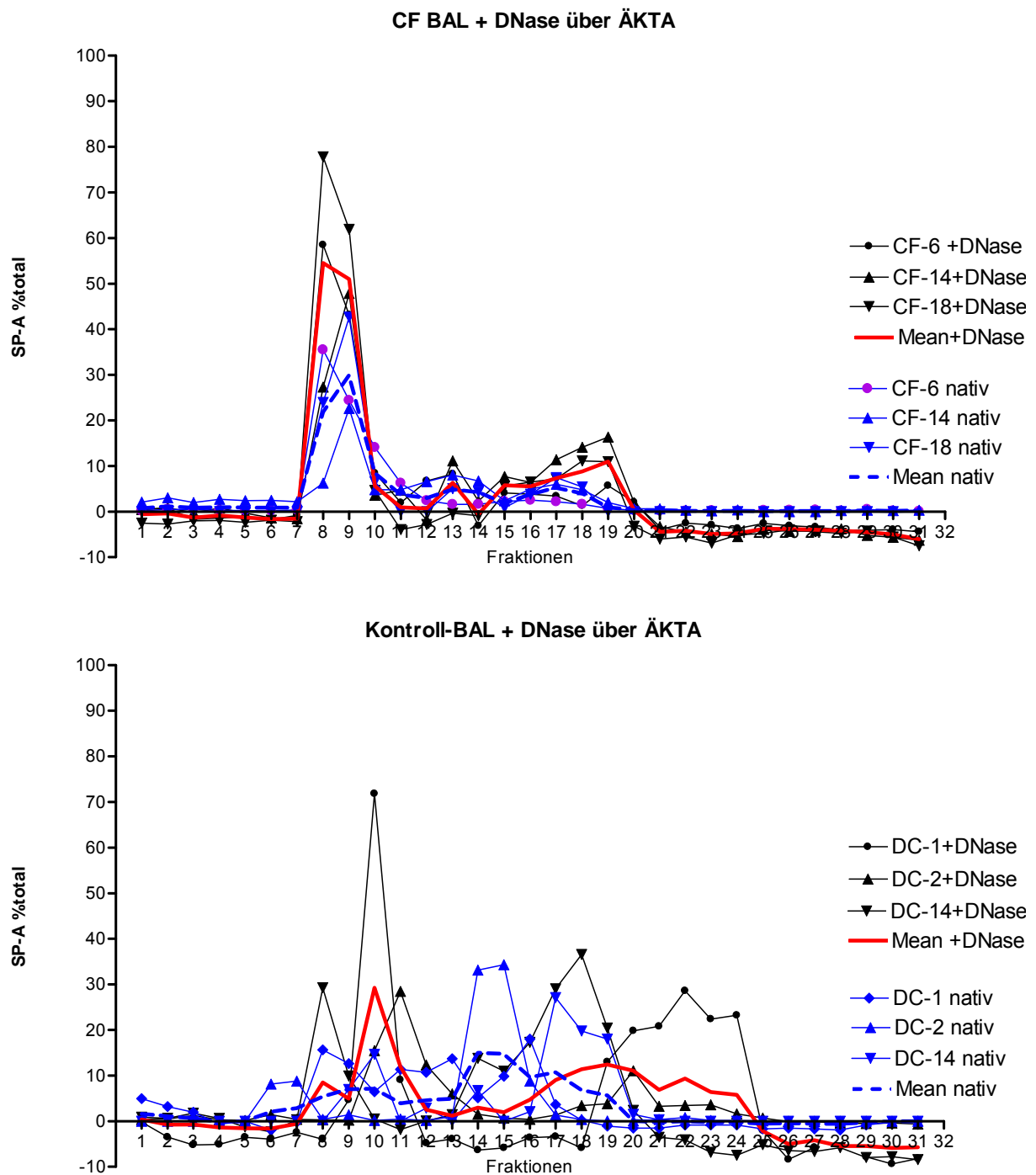


Abb. 3.45: Verteilung der SP-A oligomeren Formen der nativen BAL von CF und Kontrollen, zuvor wurde die native BAL mit DNase inkubiert. Als Vergleich sind die entsprechenden BAL ohne vorherige Inkubation mit DNase (nativ/blau Kurven) dargestellt.

Oben: CF-BAL

Unten: Kontroll-BAL

3.6.2 Invitro Inkubation mit DNase der BAL vor Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose

In Versuch 3.6.1 konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation mit DNase der erste große Peak bei F8-10 zunimmt, dadurch können folglich mehr komplexe oligomere SP-A Formen eluiert werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Inkubation der CF Lavagen mit DNase eine veränderte und eventuell verbesserte Bindungseigenschaft an Fucose bewirken kann.

Bronchoalveoläre Lavagen der CF (n=8) und Kontroll-Gruppe (n=8) wurden mit DNase (Deoxyribonuclease I, Sigma-Aldrich) bei 37°C für 10 min inkubiert.

Es wurden jeweils 1 ml BAL mit DNase inkubiert, anschließend wurde nach gewohntem Schema die Säulenchromatographie mit Fucose durchgeführt. Die „Flow-through“ und die „1.-3. Calcium-wash“ Eluate wurden zu einem Pool 1 („SP-A non-binding“) zusammengefasst. Die „1.-3. EDTA-wash“ Eluate wurden zu Pool 2 („SP-A binding“) zusammengefasst. Im SP-A ELISA wurden Pool 1 und Pool 2 der einzelnen Patienten im Vergleich und der SP-A Gehalt gemessen.

Als Kontrolle dazu wurden sowohl von CF-Lavagen (n=6) als auch von Kontroll-Lavagen (n=9) ohne vorherige DNase Inkubation der SP-A Gehalt über SP-ELISA gemessen.

In Abb. 3.46 ist die Gegenüberstellung der mit DNase inkubierten CF Lavagen im Vergleich zu den nicht inkubierten Lavagen dargestellt. Die Median-Werte von Pool 1 und Pool 2 beider Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests miteinander verglichen, es war kein signifikanter Unterschied ersichtlich. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Inkubation der BAL mit DNase vor der Durchführung der Affinitätschromatographie keinen signifikanten Effekt bzw. Verbesserung der Bindungsfähigkeit an Fucose erreicht werden konnte.

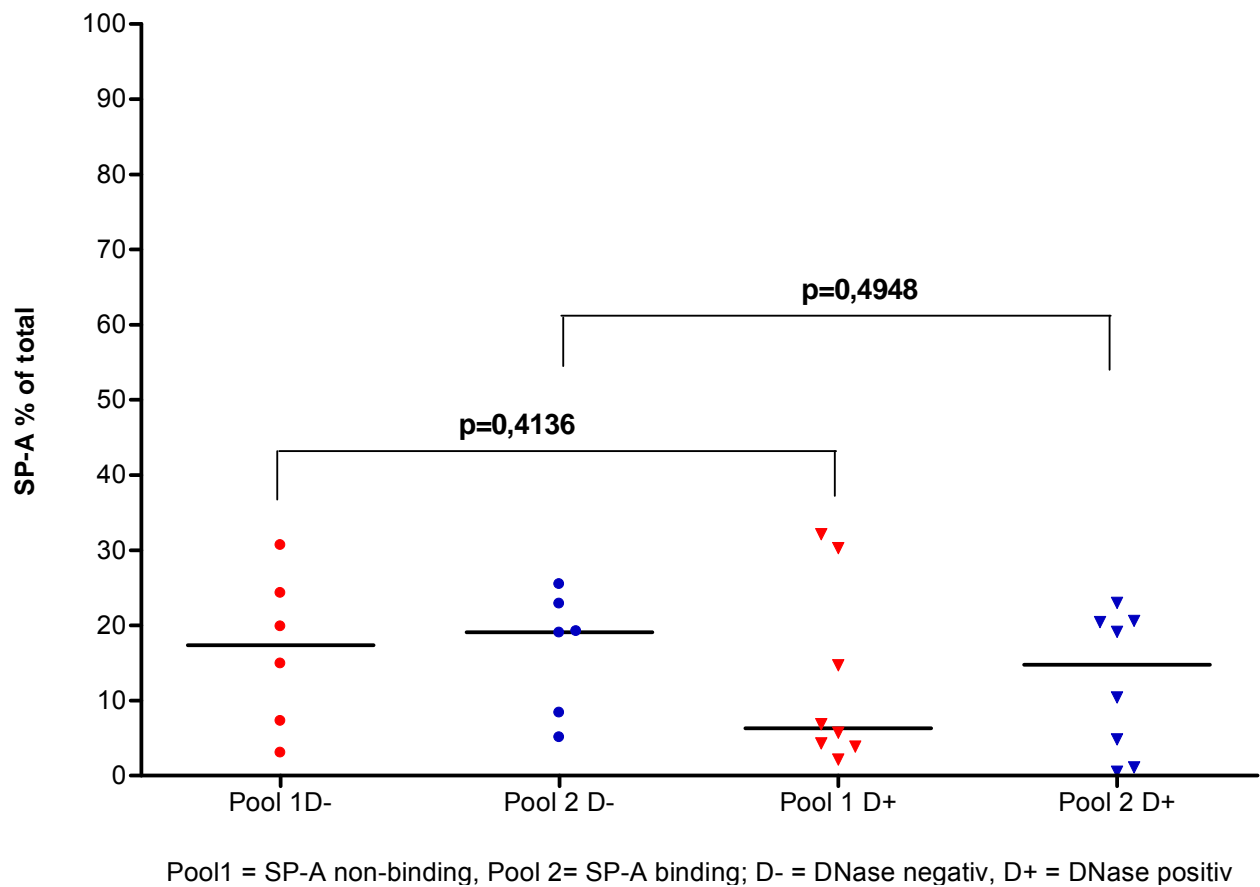
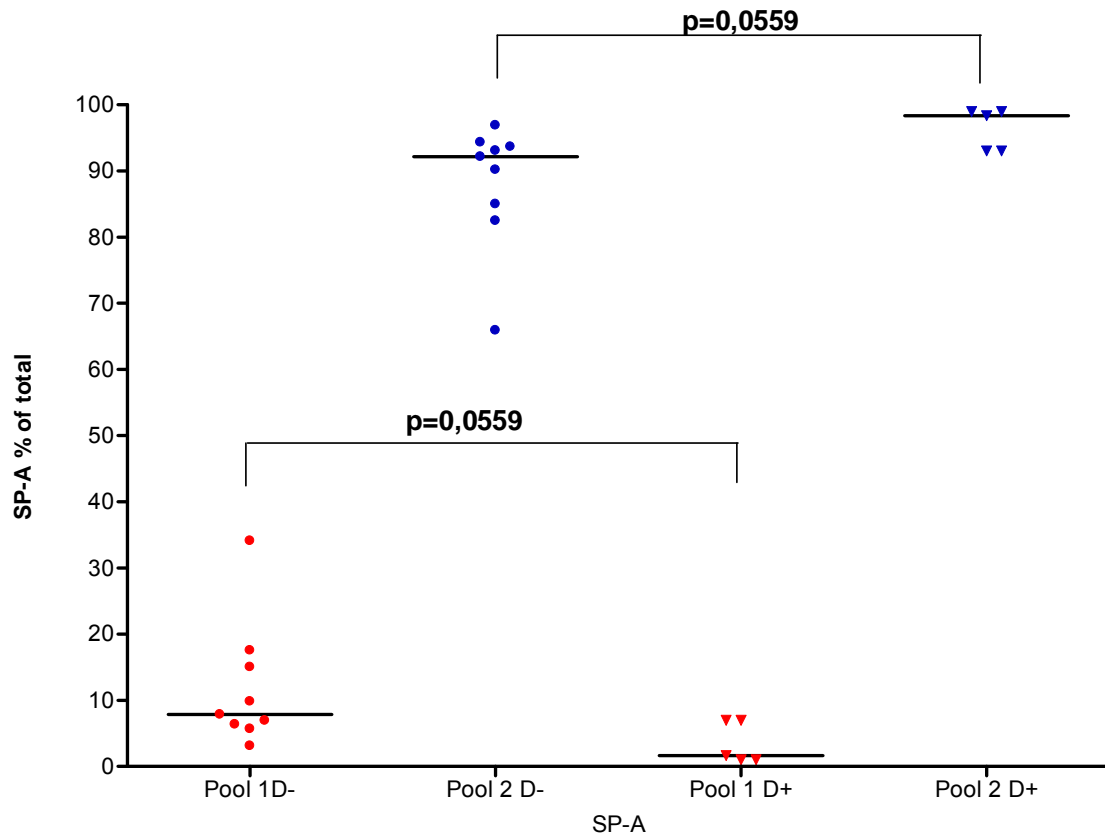


Abb. 3.46: Vergleich der SP-A Konzentrationen im SP-A ELISA von Pool 1 („SP-A non-binding“) und Pool 2 („SP-A binding“) der CF-Lavagen.

Vor der Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose wurde die CF BAL mit DNase inkubiert (D +: DNase positiv) im Vergleich dazu CF BAL, die vorher nicht mit DNase inkubiert wurde (D -: DNase negativ) inkubiert. Dargestellt sind die Mediane. Deren Vergleich erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Im Vergleich dazu wurde die Kontroll-BAL mit DNase und ohne DNase Inkubation gegenübergestellt (s. Abb. 3.47). Dabei fiel genauso wie bei den CF BAL auf, dass der Pool 1 nach der Inkubation eher kleiner ist, d.h. der Anteil an „SP-A non-binding“ ist geringer, allerdings konnte hier auch kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.



Pool1 = SP-A non-binding, Pool 2= SP-A binding; D- = DNase negativ, D+ = DNase positiv

Abb. 3.47: Vergleich der SP-A Konzentrationen im SP-A ELISA von Pool 1 („SP-A non-binding“) und Pool 2 („SP-A binding) der Kontroll-Lavagen.

Vor der Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose wurde die Kontroll-BAL mit DNase inkubiert (D +: DNase positiv) im Vergleich dazu BAL, die vorher nicht mit DNase inkubiert wurde (D -: DNase negativ) inkubiert.

Dargestellt sind die Mediane. Deren Vergleich erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die in vitro Inkubation mit DNase von BAL Proben sowohl aus der CF- wie auch aus der Kontroll-Gruppe keinen signifikanten Unterschied in der Bindungsaffinität von SP-A zu Fucose erbracht hat.

Folgerungen zu 3.6.1 und 3.6.2:

- Sowohl bei CF als auch bei den Kontrollen nimmt nach Inkubation der nativen Lavagen mit DNase in der Gelfiltrationschromatographie der erste große Peak bei F8-10 zu.
- Die Inkubation der BAL mit DNase verändert (bzw. verbessert) die Bindungseigenschaften zu Fucose nicht.

3.6.3 Bestimmung der DNA Konzentration der nativen BAL bei cystischer Fibrose und Kontrollen

Die DNA Konzentration der nativen bronchoalveolären Lavagen der Patienten- und der Kontrollgruppe wurden mittels Sybr Green Assay gemessen. In Abb. 3.48 wurde die DNA Konzentration (ng/ml) von den nativen CF- (n=24) und Kontroll-BAL (n=13) im Vergleich dargestellt.

Die DNA Konzentration der CF-BAL betrug 1641 +/- 509,6 ng/ml und die Kontroll-BAL 222,4 +/- 53,6 ng/ml. Die Median Werte beider Gruppen wurden mit Hilfe vom Mann-Whitney-Test miteinander verglichen. Die DNA Konzentration der CF Lavagen war signifikant höher als in den Kontroll Lavagen ($p=0,0044$).

	DNA Konzentration (ng/ml)
Cystische Fibrose	1641 (218,5; 1434) [32,00-8103] 24
Kontrollen	222,4 (43,6; 399,7) [0-547,9] 13

Tabelle 3. 14 Darstellung der DNA Konzentrationen von CF- und Kontroll-BAL
Median (25% Perzentile; 75% Perzentile) [Minimalwert – Maximalwert] Anzahl der Werte

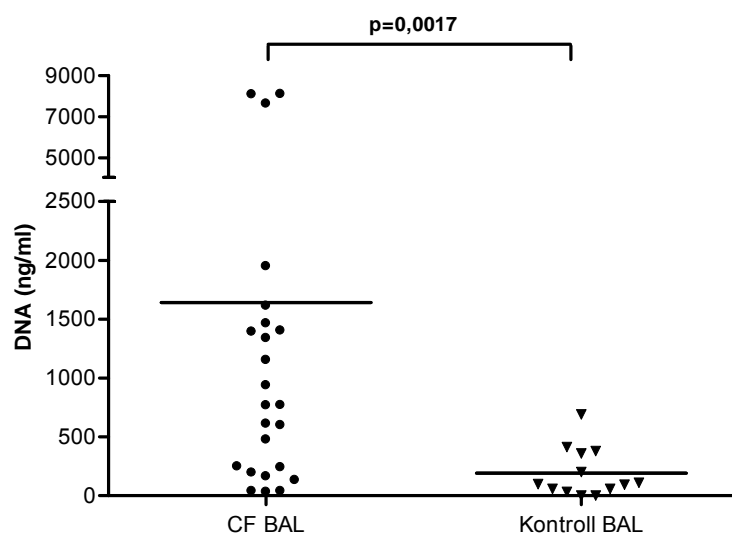


Abb. 3.48: Die Messung der DNA Konzentration durch SYBR Green Assay in nativer CF- und Kontroll BAL im Vergleich: die DNA Konzentrationen der CF Lavagen sind signifikant höher. Symbole entsprechen der einzelnen DNA Konzentrationen.

a) Vergleich der klinischen Daten der CF Patienten bezogen auf die DNA Konzentrationen der BAL

Zur besseren Übersicht wurden zwei Gruppen je nach DNA Konzentration in der BAL gebildet: DNA < 1000 ng/ml und DNA > 1000 ng/ml (s. Abb. 3.49). Die Median Werte beider Gruppen wurden mit Hilfe vom Mann-Whitney-Test miteinander verglichen.

Zwischen beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden d.h. diejenigen Patienten, die in der BAL die höhere DNA Konzentration hatten, waren nicht älter oder hatten nicht schlechtere BMI-, FEV1- oder höhere Serum IgG-Werte im Vergleich zu den CF Patienten, die die geringere DNA Konzentration aufwiesen.

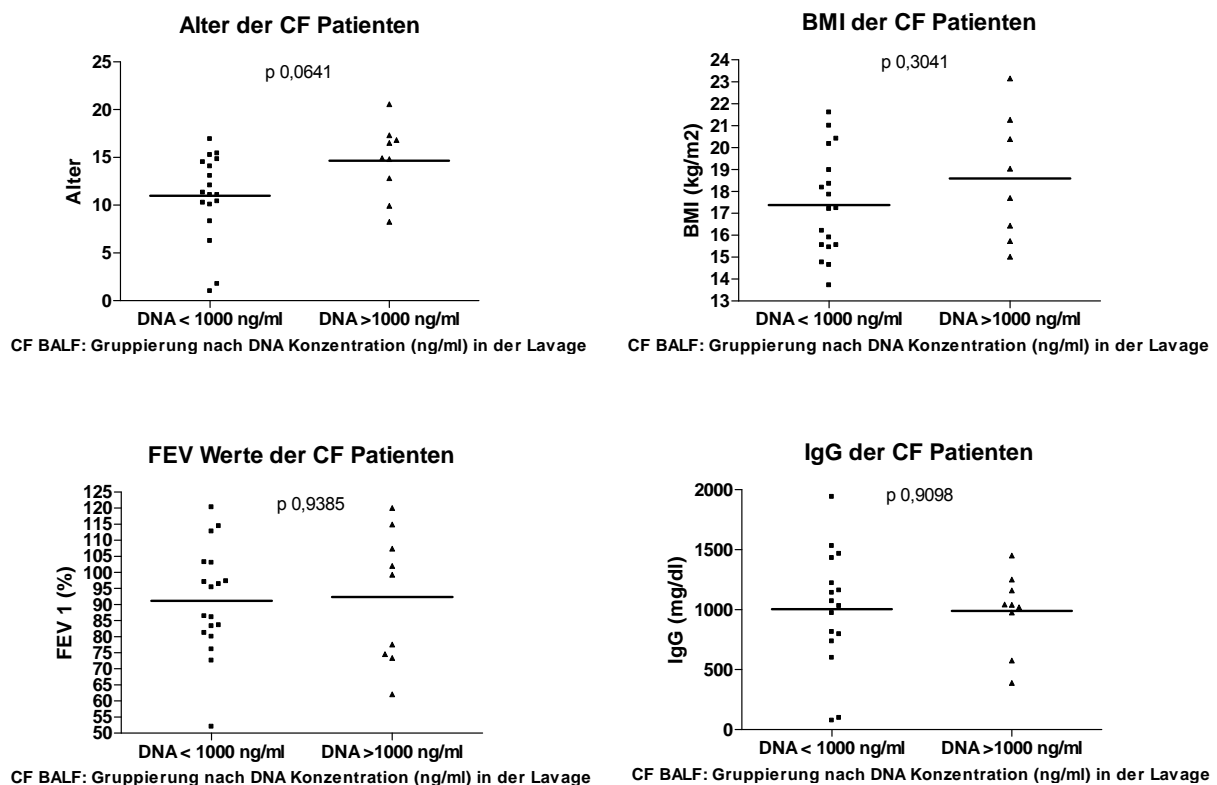


Abb. 3.49: Darstellung der DNA Konzentration der BAL bezogen auf die klinischen Parameter der CF Patienten. Symbole entsprechen der DNA Konzentration in ng/ml der BAL. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der DNA Konzentration der Lavagen und den klinischen Parametern (Alter, BMI und Lungenfunktion) der Patienten mit cystischer Fibrose gibt, wurden die DNA Konzentrationen mit den jeweiligen klinischen Parametern, die zum Zeitpunkt der Lavage ermittelt wurden, verglichen (s. Abb3.50). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang bezogen auf das Alter gefunden werden ($p=0,0154$) d.h. *je höher das Alter desto höher die DNA Konzentration in der Lavage*. Zwischen der DNA Konzentration und die BMI-, FEV1- und IgG-Werte im Serum konnte kein signifikanter Zusammenhang dargestellt werden.

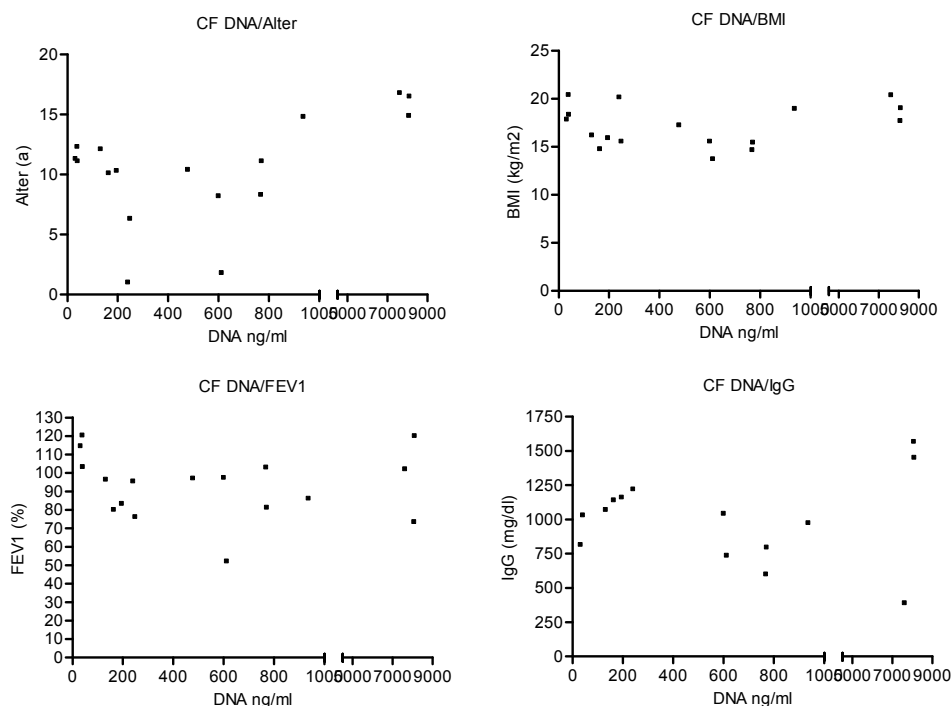


Abb. 3.50: Korrelation zwischen der DNA Konzentration der BAL und klinische Parameter der CF Gruppe. Symbole entsprechen der DNA Konzentration in ng/ml der BAL.

<i>Cystische Fibrose</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Jahre)	23	0,4989	0,0154 *
BMI (kg/m ²)	23	0,2293	0,2926
FEV ₁ (% Soll)	23	-0,2441	0,2617
IgG Serum (mU/ml)	23	0,09703	0,6840

Tab. 3.15: Korrelation zwischen den DNA Konzentrationen und klinischen Parameter der Patienten mit Cystischer Fibrose. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

b) Vergleich der BAL Daten der CF Patienten bezogen auf die DNA Konzentration der BAL

Zur besseren Übersicht wurden wieder zwei Gruppen gebildet: je nach DNA Konzentration in der BAL: DNA < 1000 ng/ml und DNA >1000 ng/ml. Innerhalb dieser Gruppen wurde die Gesamtzellzahl und die SP-A Konzentration der BAL verglichen.

Des Weiteren wurden die „SP-A non-binding“ Werte der Gruppe mit der geringeren DNA Konzentration der Lavage mit den „SP-A non-binding“ Werte der Gruppe mit der höheren DNA Konzentration verglichen. Die Median Werte beider Gruppen wurden mit Hilfe vom Mann-Whitney-Test miteinander verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (s. Abb. 3.51).

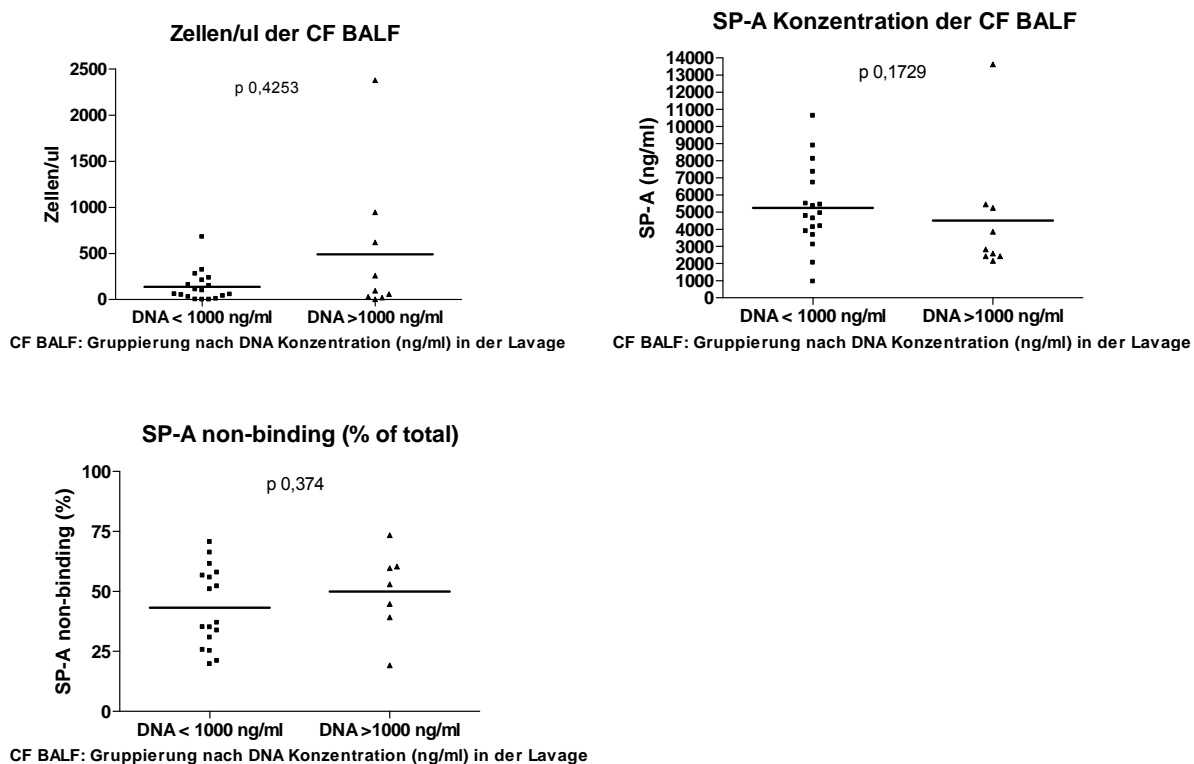


Abb. 3.51: Darstellung der DNA Konzentration der BAL bezogen auf die Gesamtzellzahl, SP-A Konzentration der CF BAL und bezogen auf „SP-A non-binding“ der CF Patienten. Symbole entsprechen der DNA Konzentration in ng/ml der BAL. Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

c) Korrelationen der DNA Konzentration und „SP-A non-binding“ der CF- und Kontrollgruppe

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der DNA Konzentrationen der BAL und den BAL Daten (Gesamtzellzahl, Neutrophilenzahl und SP-A Konzentration) gibt, wurden die DNA Konzentrationen mit den jeweiligen Parametern verglichen.

Vom besonderen Interesse war es hier auch die DNA Konzentration bezogen auf die „SP-A non-binding“ Werte – also dem in der Affinitätschromatographie nicht gebundenem SP-A – zu untersuchen.

Die Korrelationen der CF-Patienten wurden in Abb. 3.52 a diesen aus der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Im Gegensatz zur CF Gruppe zeigte die DNA Konzentrationen der Kontroll-Gruppe einen signifikanten Zusammenhang zur Gesamtzellzahl in der BAL ($p = 0,0463$): *je höher die Gesamtzellzahl der BAL der Kontrollen desto höher die DNA Konzentration in der BAL.*

Nur innerhalb der CF Gruppe zeigte die DNA Konzentrationen der BAL eine statistisch signifikante Korrelation mit der Neutrophilenanzahl ($p=0,0163$): *je höher die Neutrophilenanzahl in der BAL desto höher die DNA Konzentration in der BAL der CF Patienten.*

Die DNA Konzentrationen der BAL korrelierten nicht mit der BAL Elastasewerten bei der CF Gruppe.

Sowohl in der CF-Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der DNA Konzentration in der BAL und der SP-A Konzentrationen gezeigt werden. Es bestand auch keine Korrelation zwischen den Anteil der „SP-A non-binding“ Werten bezogen auf die DNA Konzentration beider Gruppen.

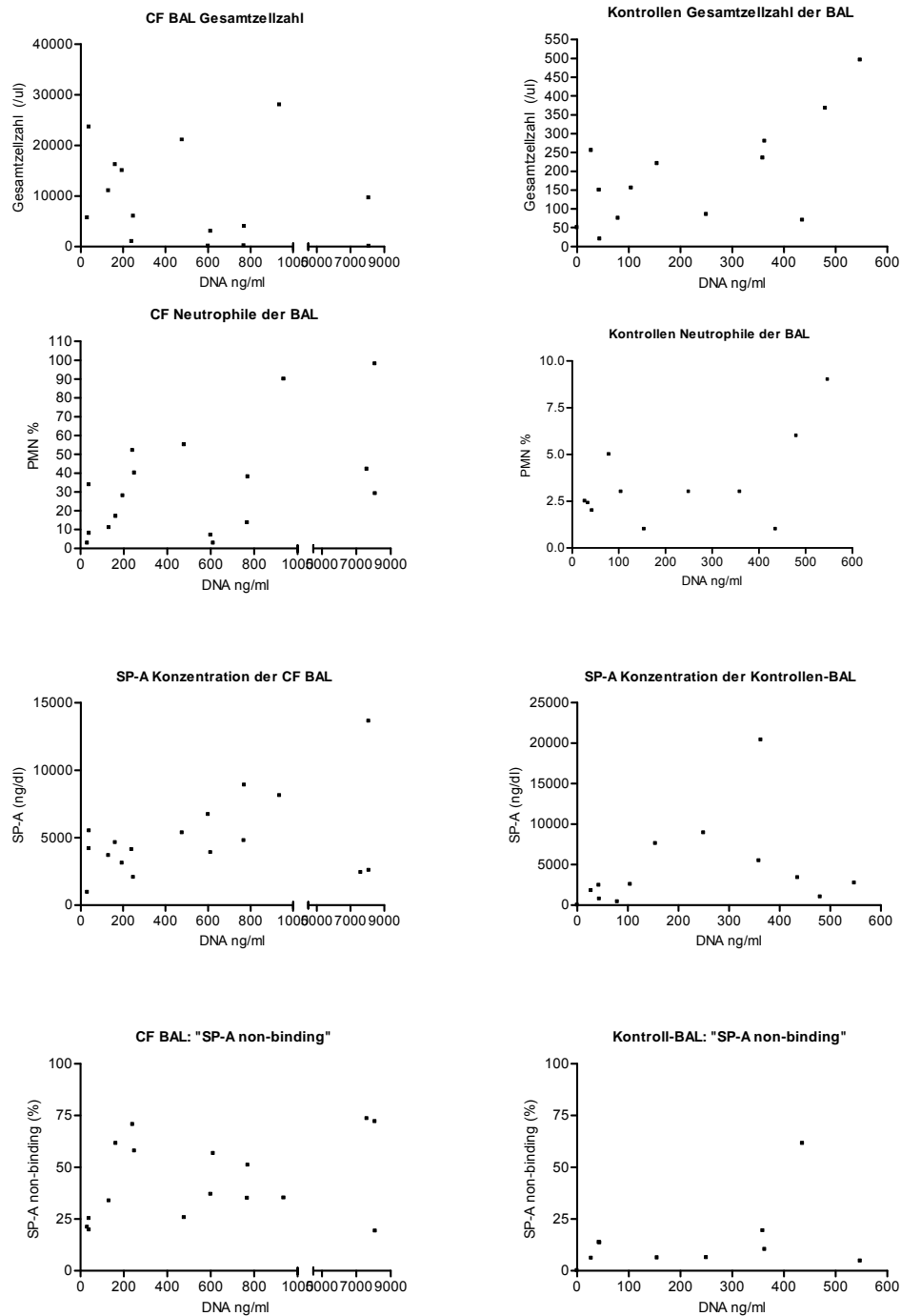
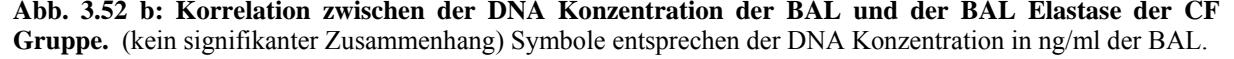


Abb. 3.52 a: Korrelation zwischen der DNA Konzentration der BAL und der Gesamtzellzahl und Neutrophilenzahl der BAL, SP-A Konzentration und „SP-A non-binding“ der CF Gruppe im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe. (Elastase nicht gezeigt s. Anhang) Symbole entsprechen der DNA Konzentration in ng/ml der BAL.



Cystische Fibrose	Wertepaare	Spearman r	p-Wert
Gesamtzellzahl (/µl)	23	0,02174	0,9216
Neutrophile (%)	23	0,4952	0,0163 *
Elastase BAL	21		0,8044

Cystische Fibrose	Wertepaare	Spearman r	p-Wert
SP-A (ng/ml)	23	0,03311	0,8808
SP-A non-binding (%)	23	0,3789	0,0821
SP-A binding (%)	23	-0,3789	-0,0821

Tab. 3.16: Korrelation zwischen den DNA Konzentrationen und der Gesamtzellzahl, Neutrophilenzahl und Elastase der BAL, SP-A Konzentration und „SP-A non-binding“ der Patienten mit Cystischer Fibrose. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

Kontrollen	Wertepaare	Spearman r	p-Wert
Gesamtzellzahl (/µl)	13	0,5604	0,0463 *
Neutrophile (%)	13	0,4184	0,2030

Kontrollen	Wertepaare	Spearman r	p-Wert
SP-A (ng/ml)	13	0,5494	0,0518
SP-A non-binding (%)	13	0,3333	0,3487
SP-A binding (%)	13	-0,3333	0,3487

Tab. 3.17: Korrelation zwischen den DNA Konzentrationen und der Gesamtzellzahl und Neutrophilenzahl der BAL, SP-A Konzentration und „SP-A non-binding“ der Kontroll-Gruppe. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

Folgerungen zu 3.6.3:

- Die DNA Konzentration der CF Lavagen war signifikant höher verglichen mit den Kontrollen.
- Je höher das Alter der CF Patienten desto höher die DNA Konzentration in der BAL.
- Je höher die Neutrophilenzahl in der BAL der CF Patienten desto höher die DNA Konzentration.
- Kein signifikanter Zusammenhang zwischen „SP-A non-binding“ und den DNA Konzentration der BAL.

3.7 „SP-A non-binding“ bei cystischer Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe

Als nächstes wurden die „SP-A non-binding“ Werte – diese entsprechen dem im Kohlenhydratbindungsassay nicht gebundenem SP-A und somit möglicherweise nicht funktionsfähigem SP-A – mit den klinischen Daten und auch mit den Zelldaten der Lavagen verglichen. Die hier durchgeführten Korrelationen der Gruppe mit cystischer Fibrose wurden der den Korrelationen der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

a) Korrelationen der „SP-A non-binding“ und der klinischen Daten der CF- und Kontrollgruppe

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen der „SP-A non-binding“ Werten und den klinischen (Alter, BMI und Lungenfunktion) bzw. den laborchemischen Parametern (Gesamt IgG, IgE im Serum und Eosinophilen im Differentialblutbild) der Patienten mit cystischer Fibrose gibt, wurden die „SP-A non-binding“ Werte mit den jeweiligen Parametern, die zum Zeitpunkt der Lavage ermittelt wurden, verglichen.

Die Korrelationen der CF-Patienten wurden in Abb. 3.53 diesen aus der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Nur bei der CF-Gruppe fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den „SP-A non-binding“ Werten und des IgE Werten im Serum: *je weniger SP-A an Fucose bindet umso höher der Gesamt IgE Wert im Serum dieser Patienten.*

Bei allen anderen Parametern konnte sowohl in der CF- als auch in der Kontroll-Gruppe kein signifikanter Zusammenhang zwischen den „SP-A non-binding“ Werten und den klinischen und laborchemischen Parametern zum Zeitpunkt der Lavage gezeigt werden.

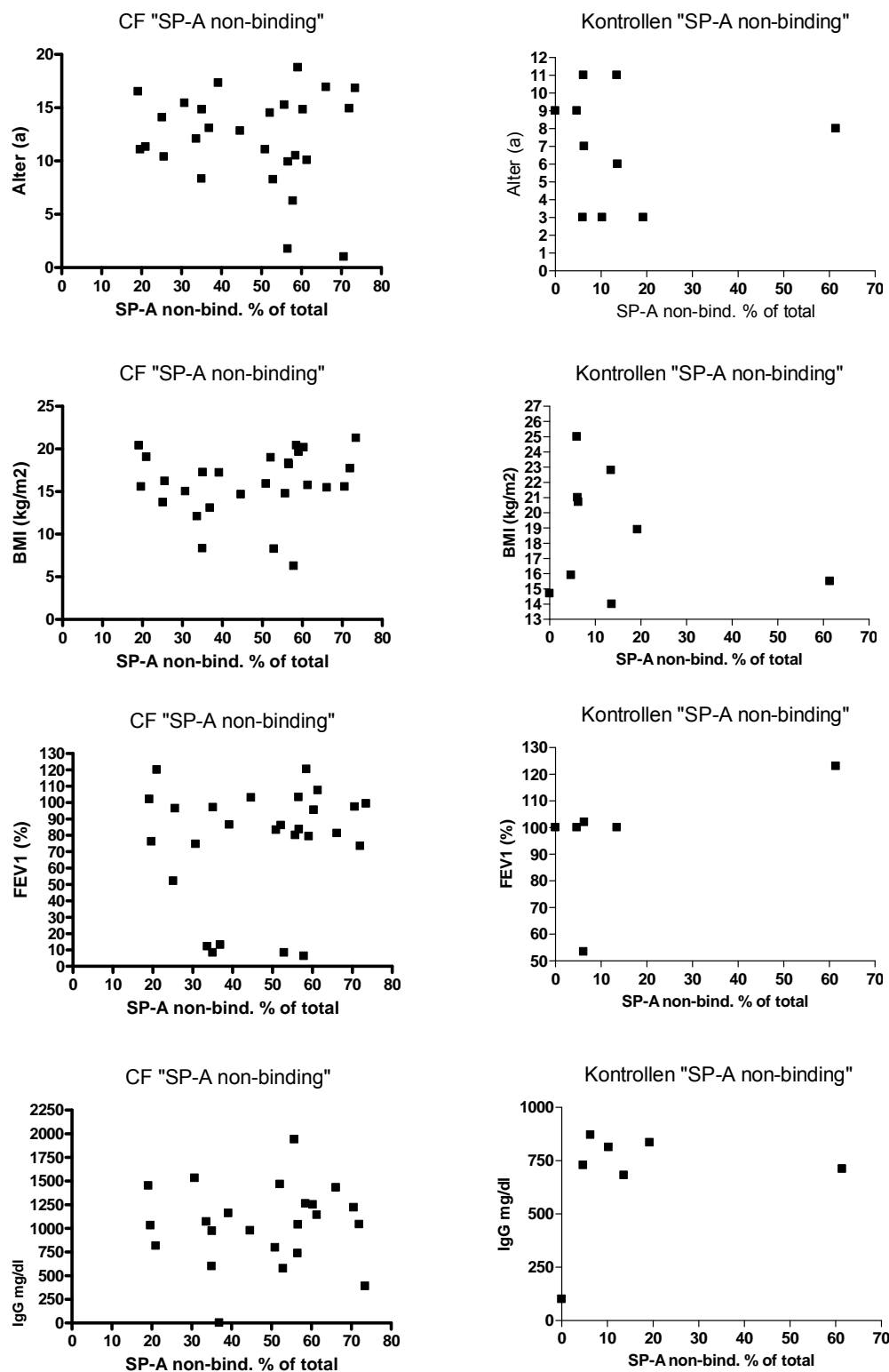


Abb. 3.53 Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total) und klinische Parameter und laborchemische Parameter der Patienten mit Cystischer Fibrose und den Kontrollen als Gegenüberstellung.

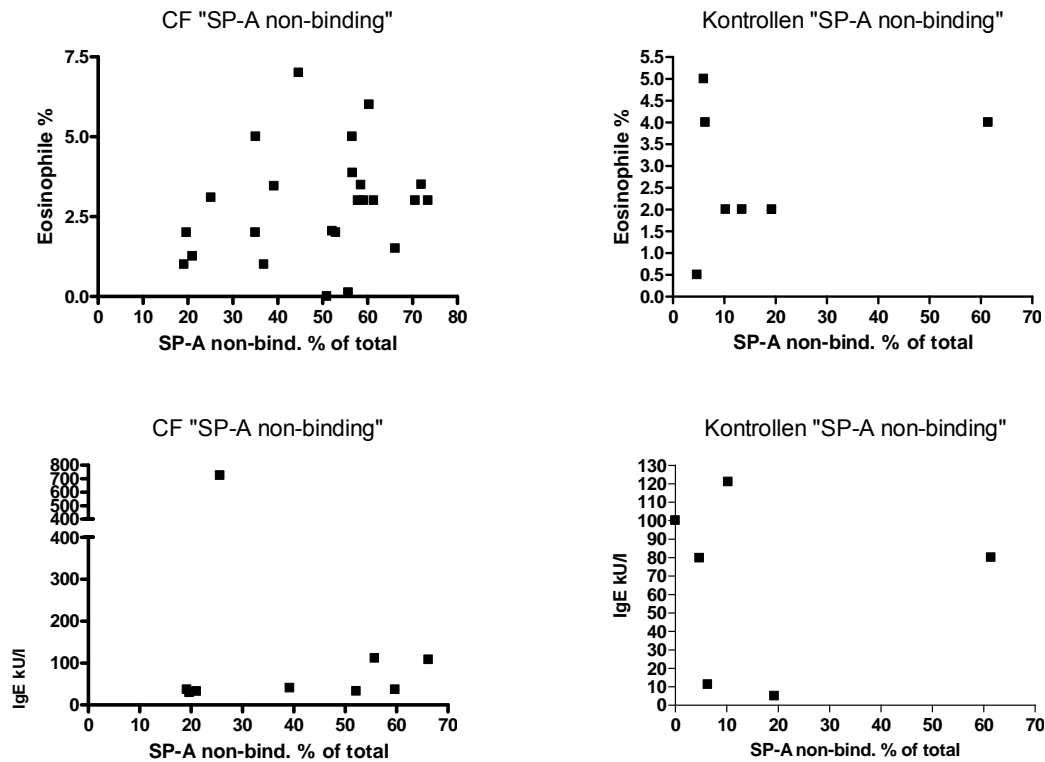


Abb. 3.52 Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total SP-A loaded on Fucose-column) und klinische Parameter und laborchemische Parameter der Patienten mit Cystischer Fibrose und den Kontrollen.

<i>Cystische Fibrose „SP-A non-binding“</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Jahre)	27	0,001832	0,9928
BMI (kg/m ²)	27	-0,05099	0,8006
FEV ₁ (% Soll)	27	-0,3694	0,0593
IgG Serum (mU/ml)	22	-0,00056	0,9980
IgE Serum (mU/ml)	9	0,7333	0,0311*
Eosinophile (%)i. Serum	24	0,3000	0,1544
<i>Kontrollen „SP-A non-binding“</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p-Wert</i>
Alter (Jahre)	10	0,2778	0,4271
BMI (kg/m ²)	10	0,1333	0,7435
FEV ₁ (% Soll)	6	-0,5768	0,2417
IgG Serum (mU/ml)	5	0,3143	0,5639
IgE Serum (mU/ml)	9	-0,1000	0,9500
Eosinophile (%)i. Serum	6	-0,4629	0,3556

Tab. 3.18: Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total SP-A loaded on Fucose-column) und klinische Parameter der Patienten mit Cystischer Fibrose und Kontrollen im Vergleich. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

b) Korrelationen der „SP-A non-binding“ und der BAL Daten der CF- und Kontrollgruppe

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den „SP-A non-binding“ Werten und den BAL Zelldaten (Gesamtzellzahl, Makrophagen, Neutrophile und Elastase) der Patienten mit cystischer Fibrose gibt, wurden die „SP-A non-binding“ Werte mit den jeweiligen Parametern, die zum Zeitpunkt der Lavage ermittelt wurden, verglichen.

Die Korrelationen der CF-Patienten wurden in Abb. 3.54 diesen aus der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

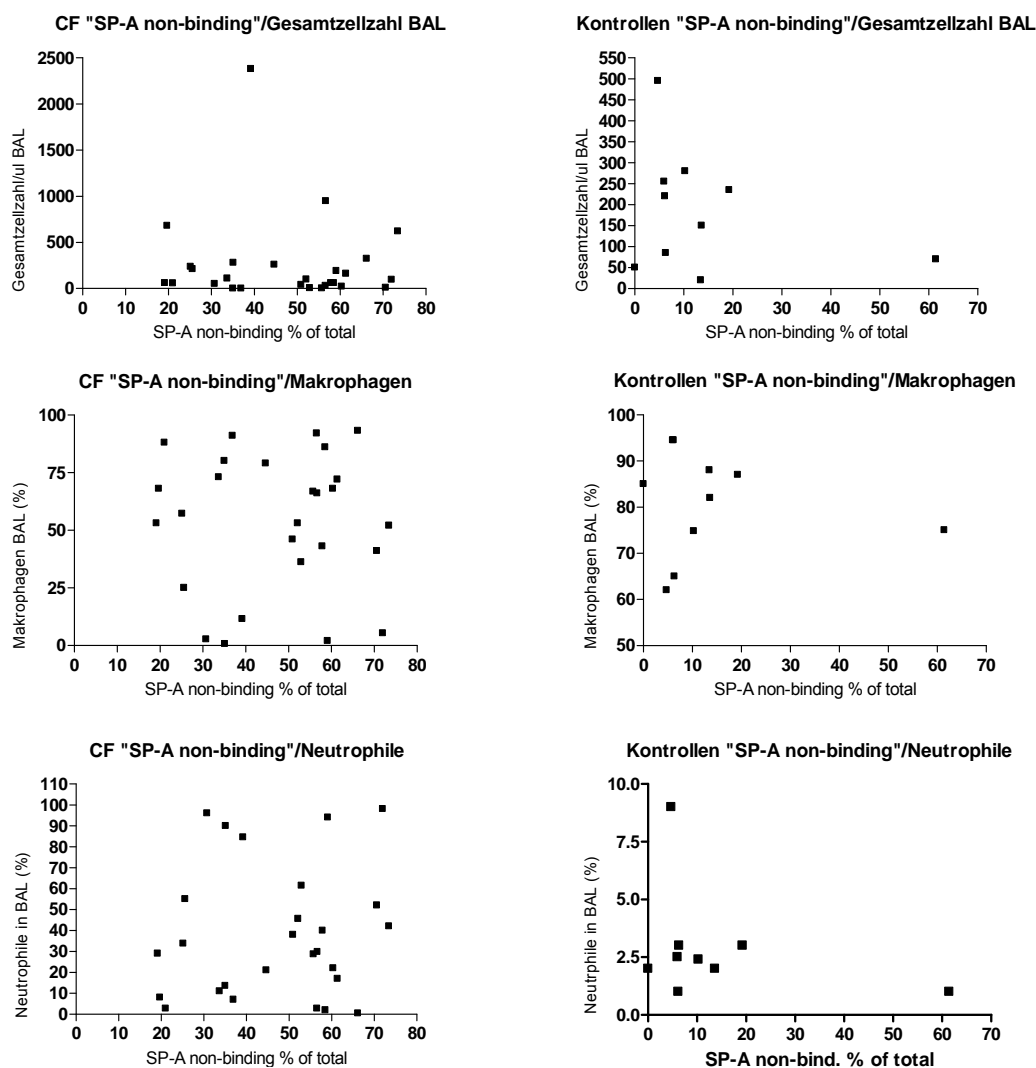


Abb. 3.54 a): Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total loaded on Fucose-column) und BAL Zelldaten der Patienten mit Cystischer Fibrose und den Kontrollen als Gegenüberstellung.

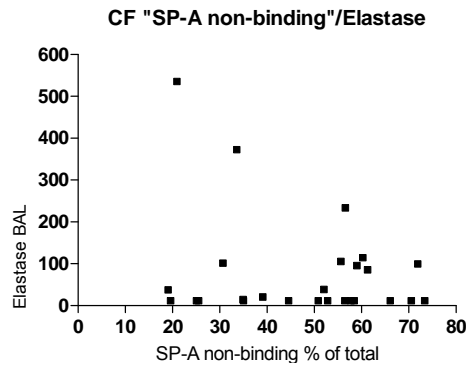


Abb. 3.54 b): Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total loaded on Fucose-column) und Elastase BAL der Patienten mit Cystischer Fibrose. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

<i>Cystische Fibrose „SP-A non-binding“</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamtzellzahl (/µl)	27	-0,001771	0,9301
Makrophagen (%)	27	-0,03939	0,8453
Neutrophile (%)	27	-0,07999	0,6917
Lymphozyten (%)	27	0,01773	0,9301
Eosinophile (%)	24	0,003887	0,9856
Elastase	25		0,8625

<i>Kontrollen „SP-A non-binding“</i>	<i>Wertepaare</i>	<i>Spearman r</i>	<i>p-Wert</i>
Gesamtzellzahl (/µl)	10	-0,2242	0,5367
Makrophagen (%)	10	-0,01216	0,9730
Neutrophile (%)	9	-0,2363	0,5517
Lymphozyten (%)	10	0,1155	0,7589
Eosinophile (%)	4	-0,06000	0,4167

Tab. 3.19 Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total SP-A loaded on Fucose-column) und BAL Zelldaten der Patienten mit Cystischer Fibrose und Kontrollen im Vergleich. Anzahl der Wertepaare, die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman und die p-Werte. * statistisch signifikant.

Sowohl in der CF-Gruppe als auch in der Kontroll-Gruppe konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den „SP-A non-binding“ Werten und den einzelnen BAL Zelldaten gefunden werden.

c) Korrelationen der „SP-A non-binding“ und der SP-A Konzentrationen der BAL der CF- und Kontrollgruppe

Des Weiteren wurden die „SP-A non-binding“ Werte bezogen auf die SP-A Konzentrationen der Lavagen der CF- und Kontroll-Gruppe miteinander verglichen. Bei beiden Gruppen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den „SP-A non-binding“ Werten und den SP-A Konzentrationen der Lavagen gefunden werden (s. Abb. 3.55).

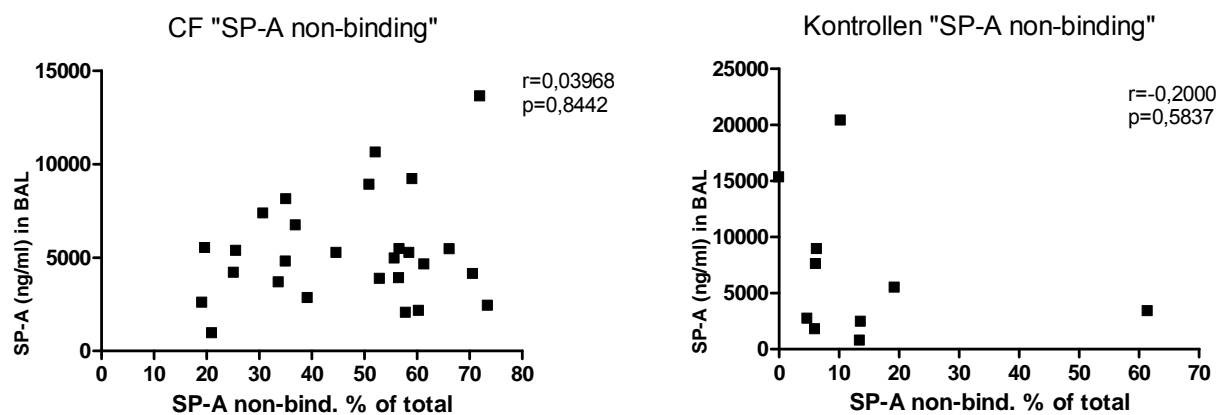


Abb. 3.55: Korrelation zwischen der „SP-A non-binding“ (% of total loaded on Fucose-column) und SP-A Konzentrationen der BAL der Patienten mit Cystischer Fibrose und den Kontrollen als Gegenüberstellung.

Angegeben sind die Werte des Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r) und die p-Werte.

Folgerungen zu 3.7 a-c:

- Je weniger SP-A an Fucose bindet (dh je höher das „SP-A non-binding“) umso höher der IgE Wert im Serum des CF Patienten.
- Kein signifikanter Zusammenhang zwischen „SP-A non-binding“ und BAL Zelldaten bei CF und den Kontrollen.
- Kein signifikanter Zusammenhang zwischen „SP-A non-binding“ und SP-A Konzentration der BAL bei CF und den Kontrollen.

d) „SP-A non-binding“ in Abhängigkeit von der Therapie mit rhDNase (Pulmozyme®)

Interessant war es, zu untersuchen, ob die Inhalationstherapie der Patienten mit cystischer Fibrose mit rhDNase (Pulmozyme®) eine Veränderung in der Bindungsfähigkeit von SP-A an Fucose bewirkt. Daher wurden die „SP-A non-binding“ Werte der CF-BAL von den Patienten mit Pulmozymen-Therapie und ohne Pulmozymen Therapie miteinander verglichen. Der Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,7985$).

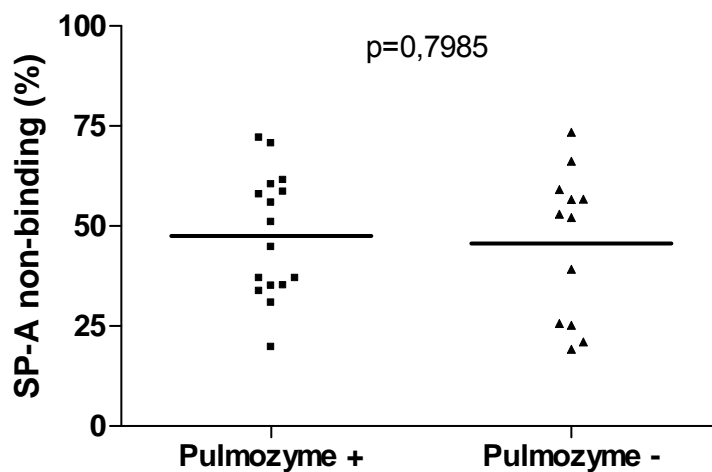


Abb. 3.56: Vergleich der SP-A non-bindinge Werte der CF Lavagen bezogen auf die Pulmozym Therapie der Patienten. Symbole entsprechen der „SP-A non-binding“ (% of total loaded on Fucose-column). Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

e) DNA Konzentration der Lavagen in Abhängigkeit von der Therapie mit Therapie mit rhDNase (Pulmozyme)

Zur Vervollständigung der Ergebnisse wurde noch untersucht, ob die DNA Konzentrationen der Lavagen der Patienten mit cystischer Fibrose sich unterscheiden je nach Therapie mit mit rhDNase (Pulmozyme®). Die DNA Konzentrationen der Lavagen von den Patienten mit Pulmozymen Therapie und ohne Pulmozymen Therapie wurden miteinander verglichen. Der Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,4529$).

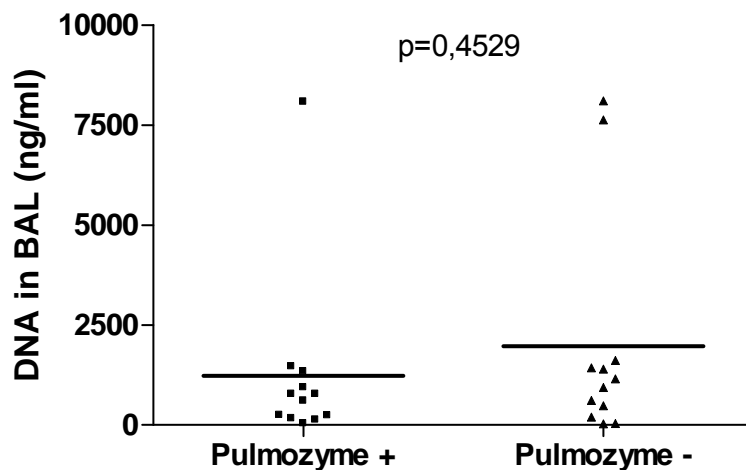


Abb. 3.57: Vergleich der DNA Konzentrationen der CF Lavagen bezogen auf die Pulmozyme Therapie der Patienten. Symbole entsprechen der DNA Konzentrationen (ng/ml). Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Folgerungen zu 3.7 d-e:

- Die Inhalationstherapie mit rhDNase (Pulmozyme®) bewirkt keinen Unterschied (bzw. keine Verbesserung) in der SP-A Bindungseigenschaft zu Fucose.
- Die Inhalationstherapie mit rhDNase (Pulmozyme®) bewirkt bei den untersuchten CF Patienten keinen Unterschied in der DNA Konzentration in der BAL.

4. Diskussion

Surfactant Protein A hat die höchste Konzentration von allen vier Surfactant Proteinen im Bronchoalveolarraum. Neben seinen Aufgaben im Surfactantmetabolismus (tubuläres Myelin und Resistenz gegen Surfactantinaktivierung), spielt es eine Rolle bei der humoralen Immunabwehr in der Lunge. Humanes SP-A bindet über seine collagenähnliche Schwanzregion spezifische Rezeptoren (Calretikulin/CD91) auf Epithel- und Immunzellen (Ariki et al. 2012). Ferner erkennt SP-A über seine Kohlenhydratbindungsdomäne (CRD) Kohlenhydratsequenzen auf Oberflächen von pathogenen Organismen und auch von Rezeptoren auf körpereigenen Zellen, wie z.B. Makrophagen. SP-A bindet auch mit unterschiedlicher Stärke eine Reihe von Monosaccharide wie Mannose, Glucose, Galactose und L-Fucose (Haagsman et al. 1987). Die Bindung der verschiedenen löslichen aber auch membran-assoziierten Liganden erfolgt kalziumabhängig. Diese Interaktionen waren Thema dieser Arbeit.

In der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) entsteht aufgrund eines genetisch defekten Chloridtransporters eine Retention von viskösem Sekret, die eine bakterielle Besiedlung und Infektion der Atemwege begünstigt. Durch die ständige Auseinandersetzung mit Mikroorganismen kommt es zu einer von neutrophilen Granulozyten beherrschten chronischen Inflamationsreaktion im bronchoalveolären Kompartiment.

Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur bzw. die makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A bei Patienten mit cystischer Fibrose (CF) zu untersuchen. Als Kontrollgruppe wurden Proben von Patienten mit infektgetriggerten rezidivierenden Bronchitiden untersucht, die zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch stabil waren und bei denen keine bronchoalveoläre neutrophile Inflammation nachgewiesen wurde.

Um Hinweise auf Veränderungen des lokalen Abwehrsystems der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose zu untersuchen, wurde die Funktion von SP-A in der Affinitätschromatographie mit Fucose untersucht.

4.1. Patienten- und Kontrollkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden bronchoalveoläre Lavagen von 28 Patienten mit cystischer Fibrose untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Patienten klinisch stabil, d.h. sie hatten keine akute pulmonale Exazerbation, keine allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und sie hatten eine stabile Lungenfunktion. Die Kontrollgruppe bestand aus 14 Patienten mit rezidivierender Bronchitis. Die Patienten mit cystischer Fibrose wurden im Rahmen der BEAT Studie lavagiert und waren signifikant älter: 11,7 (10-15) Jahre gegenüber 7,7 (3-11) Jahre. Dies hängt damit zusammen, dass es sehr junge Patienten waren, die aufgrund von rezidivierenden Bronchitiden zur diagnostischen Zwecken eine Bronchoskopie mit BAL bekommen haben. Sowohl für SP-A als auch für die Neutrophilenzahl in der BAL besteht in diesem Altersbereich keine Altersabhängigkeit, sodass durch den kleinen Altersunterschied bezüglich dieses Parameters keine signifikanten Probleme zu erwarten sind.

Bei 15 CF Patienten fanden sich im Rachenabstrich, Sputum bzw. BAL die CF typischen Keime *Staphylokokkus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Kontrollgruppe hatte eine normale Rachenflora im mikrobiologischen Befund des Rachenabstriches bzw. BAL.

4.2. Zytologische und bakteriologische Daten

Die CF BAL zeigte eine signifikant höhere Gesamtzellzahl und eine höhere Neutrophilenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die für cystische Fibrose charakteristische Dominanz neutrophiler Granulozyten in der BAL konnte nachgewiesen werden, obwohl die Patienten zum Zeitpunkt der BAL Untersuchung klinisch stabil waren. Dies entspricht der Arbeit von Konstan et al, bei der gezeigt wurde, dass auch bei CF Patienten mit einem stabilen klinischen Verlauf und einer mild ausgeprägten Lungenbeteiligung in der BAL ein hoher Anteil an neutrophilen Granulozyten und folglich auch eine hohe Konzentration an neutrophilen Elastasen gefunden wurde (Konstan et al. 1994). Selbst bei Neugeborenen und jungen Kindern mit Cystischer Fibrose, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keinen klinischen Hinweis auf eine Atemwegsinfektion hatten, konnte bereits eine Inflammation der unteren Atemwege nachgewiesen werden (Armstrong et al. 1997; Armstrong et al. 2005).

4.3. Surfactant Protein A (SP-A) bei cystischer Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe

Die SP-A Gesamtkonzentrationen der bronchoalveolären Lavagen (BAL) der cystischen Fibrose Gruppe und der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht (ELISA). Es waren auch keine signifikant niedrigere SP-A Gesamtkonzentrationen innerhalb derjenigen CF Patienten zu finden, die eine chronische bakterielle Besiedlung (n=15) hatten.

In der Literatur wurde beschrieben, dass in BAL-Flüssigkeiten von schwerer betroffenen Patienten mit cystischer Fibrose im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen niedrigere Konzentrationen von SP-A gemessen wurden (Griese, Birrer, and Demirsoy 1997). Als Ursache hierfür wurde eine gestörte Synthese, Sekretion und Recycling von SP-A durch die chronische Entzündungsreaktion in der Lunge oder ein Verlust von SP-A durch Aggregation im Mucus vermutet. Die Patienten aus dieser Studie hatten ebenfalls einen signifikant höheren Neutrophilenanteil der BAL im Vergleich zu den Kontrollen.

Ratjen beschreibt in seiner Arbeit, dass es mit zunehmendem Alter der CF Patienten aufgrund von einerseits reduzierter SP-A Produktion und andererseits proteolytischer Degradation zur Reduzierung der SP-A Konzentration kommt (Ratjen 1996).

Bei Erwachsenen und Kindern mit bakteriellen Pneumonien zeigten sich neben einer Verminderung des Phosphatidylcholins in der bronchoalveolären Lavage auch eine deutliche Verminderung der SP-A Konzentration (Gunther et al. 1996; Noah et al. 1996). Bei Kindern mit einer akuten viralen Bronchiolitis konnten in der BAL auch deutlich niedrigere Konzentrationen an SP-A im Vergleich zur BAL von gesunden Kontrollen gemessen werden (Dargaville, South, and McDougall 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte anders als erwartet innerhalb der Patientengruppe mit CF eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der SP-A Konzentrationen und der Neutrophilenzahl gefunden werden: je höher die Neutrophilenzahl in der BAL desto höher die SP-A Konzentration in der BAL der CF Patienten. Es besteht allerdings kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SP-A Gesamtkonzentrationen und den Elastasewerten der CF BAL. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in unserer wenig betroffenen Patientengruppe keine

stark ausgeprägte Proteolysereaktion bestand und dadurch die SP-A Gesamtkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen nicht reduziert wurde.

In der Arbeit von Hull et al. (Hull et al, 1997) wurden Kinder und Jugendliche mit CF untersucht, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keine akute pulmonale Infektion hatten, es konnten höhere SP-A Konzentrationen in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Die untersuchten CF Lavagen hatten ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit einen signifikant höheren Neutrophilenanteil. Vermutlich bewirkte die bei der cystischen Fibrose persistierenden endobronchialen Inflammationsreaktion die Hochregulation der SP-A Sekretion.

4.4 Makromolekulare Organisation von Surfactant Protein A (SP-A) der bronchoalveolären Lavagen der CF- und Kontrollgruppe im Vergleich

Um strukturelle Unterschiede bzw. die makromolekulare Organisation von pulmonalem Surfactant Protein A (SP-A) darzustellen, wurden die nativen bronchoalveolären Lavagen (BAL) von den CF Patienten und der Kontrollgruppe mittels Gelfiltrationschromatographie (Strong et al. 1998) aufgetrennt: je größer die SP-A Oligomere desto früher werden sie eluiert. SP-A wurde aus den einzelnen Eluaten mittels Dot-blot-Assay nachgewiesen.

Sowohl bei den CF Patienten als auch bei der Kontrollgruppe wurde natives SP-A nicht ausschließlich als Octadecamer und komplexe oligomere Formen aufgetrennt, sondern es wurden auch kleine oligomere Formen nachgewiesen.

SP-A wurde in drei großen Peaks eluiert: der erste in Fraktion 8-10 beinhaltet die Octadecamere und höheren multimeren Formen, der zweite in Fraktion 14-17 zeigt die 6-12-mere und der dritte Peak in Fraktion 19-21 stellt die kleinen Oligomeren Formen (Dimere und Trimere) dar.

Innerhalb der CF Gruppe ist der erste Peak der größte, d.h. SP-A liegt in der nativen CF BAL vorwiegend in höheren multimeren Formen vor. Der zweite und dritte Peak sind im Vergleich zu der Kontrollgruppe sehr klein, d.h. die mittelgroßen und die kleinen oligomeren Formen sind in der CF Gruppe sehr wenig vertreten. Bei der Kontrollgruppe ist der erste und zweite Peak nahezu gleichgroß, d.h. bei diesen Patienten liegt SP-A gleichermaßen als komplexe multimeren Formen und als mittelgroße Oligomere vor.

In der Literatur sind nicht viele Studien zur Darstellung der oligomeren SP-A Formen zu finden. Hickling et al. (Hickling et al. 1998) untersuchten BAL von Patienten mit Birkenpollen-

allergie (n=11) und verglich diese mit gesunden Kontrollen (n=4). Dabei wurde gezeigt, dass der erste Peak der BAL der Pollenallergiker deutlich kleiner war im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Es war ein Shift zu den kleineren oligomeren Formen zu beobachten: d.h. der zweite und dritte Peak innerhalb der Allergiegruppe war deutlich größer als bei den Gesunden. Die Autoren hypothesieren, dass der Shift im Rahmen von oxidativen Einflüssen und Verlust von Disulfidbrücken entsteht und aus diesem Grund könnten komplexe oligomere Formen nicht mehr ausgebildet werden.

In einer Studie unserer Gruppe (Griese et al., 2002) wurden Lavagen von Kindern mit gastroösophagealen Reflux (n=6) untersucht und mit gesunden Kontrollen (n=6) verglichen. Bei den Patienten mit GÖRK war der erste Peak im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant kleiner, der zweite bzw. dritte Peak war größer im Vergleich zu den Gesunden. Eine Veränderung des Polymerisationsgrades der Surfactantproteine bei den GÖRK Patienten zugunsten kleinerer SP-A Oligomerenformen konnte somit festgestellt werden. Hier liegt die Annahme nahe, dass SP-A als direkte oder indirekte Folge des gastroösophagealen Reflux verändert wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Hickling et al., die bei verschiedenen Lungenerkrankungen eine Depolymerisation von SP-A (niedriger Polymerisationsgrad) durch oxidativen Stress und eine damit resultierende funktionelle Beeinträchtigung von SP-A annehmen.

Interessanterweise finden wir in der vorliegenden Arbeit bei den CF Lavagen, dass der SP-A Oligomerisierungsgrad zugunsten der großen und komplexen SP-A Formen verschoben ist. Diese Aussage ist relativ stabil, da das Muster in 13 Patienten nachgewiesen werden konnte. Allerdings war der zweite und dritte Peak der CF BAL deutlich vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den in der Literatur beschriebenen gesunden Kontrollen. Dies könnte mit proteolytischen Veränderungen am Surfactant durch die chronische neutrophile Inflamationsreaktion bedingt sein, die sich möglicherweise bereits im Bereich der hier vorliegenden recht geringen Neutrophilie auswirken könnten. In der Literatur ist beschrieben, dass durch die neutrophile Inflamationsreaktion Proteasen, Lipasen und Oxidantien freigesetzt werden, die biochemische Veränderungen an Surfactant hervorrufen können (Holm et al. 1991; Konstan et al. 1994; Haddad et al. 1994; Ryan, Ghassibi, and Liau 1991) und dass kleinere SP-A Oligomere schneller durch Elastasen und Oxidation zerstört werden (Stuart et al.

1996). Das könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit die mittelgroßen Oligomere und die Di- und Trimere in ihren Mengen in den CF Lavagen reduziert sind.

Alternativ kann auch eine Vermehrung der komplexen Formen von SP-A vorliegen. Es kann z.B. spekuliert werden, dass durch die neutrophile Inflamationsreaktion und die nachgewiesene bakteriellen, chronisch vorliegenden Erreger eine Stimulation der Bildung kompetenter komplexer SP-A Multimere induziert wird.

4.5 Affinitätschromatographie der BAL von Patienten mit cystischer Fibrose und der Kontrollen

Wie oben beschrieben unterscheiden sich die SP-A Gesamtkonzentrationen in der BAL von den Patienten mit cystischer Fibrose und den Kontrollen nicht signifikant. Interessant war zu untersuchen, ob es qualitative Unterschiede der SP-A Funktion bei cystischer Fibrose im Vergleich zu den Kontrollen gab. Die Funktion von SP-A wurde in der Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose untersucht gemäß der Fähigkeit, dass SP-A über seine CRD Region Kohlenhydrate erkennen und binden kann. Die Bindung erfolgt kalziumabhängig. Dadurch konnten die Mengen an zur Bindungsinteraktion fähigen und nicht bindenden SP-A ermittelt werden.

In einem nachgeschalteten Schritt wurde dann die makromolekulare Anordnung von „SP-A non-binding“ von der CF- und Kontrollgruppe mittels Gelfiltrationschromatographie untersucht. Nur die CF Lavagen zeigten bei dem nicht-bindenden SP-A einen großen ersten Peak bei Fraktion 8-10 wie in der nativen CF Lavage. Dies bedeutet, dass nicht-funktionsfähiges SP-A bei CF auch komplexe Formen enthielt. Bei den Kontrollen zeigte sich bei „SP-A non-binding“, dass der erste und zweite Peak ähnlich groß waren. Dies bedeutet, dass das SP-A bei den Kontrollen, welches nicht an Fucose binden konnte, also nicht funktionsfähiges SP-A, vorwiegend im kleineren oligomeren Bereich vorlag.

Die makromolekulare Anordnung von „SP-A binding“ von der CF- und Kontrollgruppe unterschied sich nicht. Hier war der erste Peak bei beiden Gruppen am größten. Dies deutet darauf hin, dass „SP-A binding“ d.h. funktionsfähiges SP-A (SP-A, das an Fucose binden kann) vorwiegend aus 18-meren und auch komplexen Oligomeren Formen besteht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei CF als auch bei den Kontrollen ein hoher Polymerisierungsgrad von SP-A einer guten Funktion entspricht. Dieses Ergebnis stimmt mit den in vitro und in vivo Studien zur Funktion der Collekline in Abhängigkeit ihrer oligomeren Struk-

tur überein (Crouch, 1998). In der Arbeit von Oberley and Snyder wurde gezeigt, dass natives humanes SP-A im Vergleich zu rekombinanten SP-A1 bzw. SP-A2 aus höher molekularen Multimeren bestand und diese in der Fucose-Affinitätschromatographie mit einer höheren Affinität an Fucose binden konnte (Oberley and Snyder, 2002). Neu in der hier vorliegenden Arbeit ist, dass die nativen CF Lavagen einen hohen Anteil an komplexen SP-A Oligomeren aufweisen, die nicht alle voll funktionsfähig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsaffinität von SP-A an Fucose bei einer Calcium Konzentration von 3 mM untersucht. Diese entspricht einerseits dem physiologischen Calcium Gehalt im Alveolarraum und andererseits ist eine Konzentration von $3 \pm 0,1$ mM freiem Ca^{2+} für die Aggregation von SP-A notwendig (Ruano et al., 1996; Heinrich, Griesse 2010).

Interessant war, dass in der vorliegenden Arbeit durch die Affinitätschromatographie mit Fucose gezeigt werden konnte, dass im Durchschnitt ca. 52 % vom Gesamt SP-A bei den CF Lavagen nicht an Fucose binden konnten („SP-A non-binding“) und ca. 48 % vom Gesamt SP-A („SP-A binding“) an Fucose binden konnten.

Die Makromolekulare Anordnung von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ wurde zusätzlich in der 1D-Gelelektrophorese dargestellt und zeigte signifikante Unterschiede bei der CF Gruppe: „SP-A non-binding“ war vorwiegend als niedermolekulares SP-A (Mono- und Dimere) vorhanden. Es konnten auch Banden mit sehr niedrigem Molekulargewicht (16,9-27 kDa) detektiert werden, diese entsprechen SP-A Fragmenten, sie hatten mit 15 % einen hohen Anteil. Bei den Lavagen, die SP-A Fragmente hatten, wurde auch ein hoher Anteil an Neutrophilen (>80 %) gefunden.

„SP-A binding“ liegt als Mono-, Dimere vor, es sind hier aber auch Trimere und Tetramere vorhanden. SP-A Fragmente lagen hier nur zu 1,8 % vor.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass SP-A, das nicht Kohlenhydrate (Fucose) binden kann, vorwiegend aus niedermolekularen Formen besteht, die als zum Teil auch als Proteolyseprodukte zu werten sind. Die Proteolyse bewirkt wahrscheinlich eine Depolymerisierung von SP-A und so einen Shift zu niedermolekularen SP-A Formen. Diese sind dann nicht funktionsfähig, da sie nicht an Kohlenhydrate binden können. Die dargestellten SP-A Fragmente können als noch stärkere Proteolyseprodukte betrachtet werden. In der Arbeit von Bredow et al. (von Bredow et al. 2001) konnte ebenfalls SP-A mit sehr niedrigem

Molekulargewicht (< 20 kDa) in CF Lavagen gefunden werden. Die als Degradationsprodukte von SP-A identifiziert wurden. Die Kontrollen zeigten keine SP-A Degradationsprodukte.

Im Gegensatz zu den CF Lavagen zeigte die Bindungsaffinität von SP-A an Fucose aus den 10 Kontroll-BAL einen signifikanten Unterschied. Im Durchschnitt konnten nur ca. 8,3 % vom SP-A Gesamtvolumen nicht an Fucose binden („SP-A non-binding“) und ca. 91,7 % konnten an Fucose binden („SP-A binding“).

Das bei den Kontrollen nicht funktionsfähige SP-A bestand zu gleichen Anteilen aus Mono-, Di-, Tri- und Tetrameren und hatte somit eine ähnliche Oligomerenverteilung wie bei den CF-Lavagen. Allerdings wurden bei den Kontrollen keine SP-A Fragmente gefunden. Die Verteilung der Oligomeren des funktionsfähigen SP-A der Kontrollen ist ähnlich der CF Gruppe.

Mildes nichtionisches Tensid wie TritonX-100 (Octoxinol-9), das bei der Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose verwendet wurde, kann die SP-A Aggregation bzw. die SP-A Selbstaggregation leicht stören (s.Anhang 6.2.2). Durch Zugabe von 0,1 % Triton X 100 zur nativen BAL wurde der erst Peak etwas kleiner im Vergleich zur nativen BAL. Crouch et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass SP-A in Anwesenheit von Calcium und Triton X 100 (0,1%) agglutinieren konnte (Crouch et al. 2000). Sie zeigten, dass bei Anwesenheit von Triton X 100 die Oligomerisierung von SP-A und dadurch die Funktion von SP-A nicht beeinflusst wurden.

Zusammengefasst wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass SP-A aus der BAL von Patienten mit cystischer Fibrose eine signifikant verminderte Funktion im Vergleich zu den Kontroll-Lavagen zeigte. Bei den Kontrollen konnte nahezu das gesamte SP-A an Fucose binden im Gegensatz zu den den CF Lavagen, da konnte nur ca. 52 % vom SP-A binden. Es konnte mit zwei unterschiedlichen Methoden (Gelfiltrationschromatographie und 1D-Gelelektrophorese) gezeigt werden, dass das funktionsfähige SP-A, d.h. das SP-A, das an Fucose in der Affinitätschromatographie binden konnte, sowohl bei der CF Gruppe als auch bei den Kontrollen eine ähnliche strukturelle Verteilung der Oligomerenformen bzw. einen ähnlichen Polymerisierungsgrad besaß. Der wesentliche Unterschied zwischen den Patientengruppen bestand darin, dass nur die CF Lavagen SP-A Fragmente besaßen.

4.6. Einfluss von DNA auf die Bindungseigenschaften von SP-A in der BAL

Die DNA Konzentration der nativen bronchoalveolären Lavagen der Patienten mit cystischer Fibrose waren signifikant höher als die der Kontroll Lavagen. Diese Befunde sind im Einklang mit der bestehenden chronischen Inflammationsreaktion in der Lunge der CF Patienten. Zuvor hatten Ratjen et al. gezeigt, dass in bronchoalveolären Lavagen von CF Patienten die durchschnittliche DNA Konzentration $17,6 \pm 11,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$ beträgt (Ratjen et al. 2005). Diese Werte entsprechen in etwa den DNA Konzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit gemessen wurden.

In der nativen CF BAL wurden vorwiegend komplexe SP-A Formen gefunden. Es ist bekannt, dass die BAL der CF Patienten sehr viele Liganden für SP-A enthält: Lipide, Kohlenhydrate an Oberflächen von Pathogenen, freie DNA und DNA, die von apoptotischen Zellen präsentiert wird. Diese Liganden können mit SP-A interagierend so zu einer Aggregatbildung von SP-A beitragen. Es sind auch Protein-Protein-Interaktionen zwischen den CRD-Regionen von SP-A beschrieben (Ruano et al. 1996).

Die Bindung von SP-A über seine CRD an DNA, findet bei physiologischen Salzkonzentrationen statt (Palaniyar et al., 2004). Diese Vorgänge werden nicht durch milde Detergentien beeinflusst. Aus diesen Komplexen konnte DNA aus der nicht-kovalenten Bindung an SP-A erst durch Proteinasen freigesetzt werden (Palaniyar et al. 2004). Diese Zusammenhänge könnten eine weitere Erklärung dafür darstellen, warum bei der nativen CF BAL der erste Peak größer ist als der bei den Kontrollen: infolge höherer DNA Konzentrationen der BAL könnte eine Selbstaggregationen zu komplexen SP-A Formen stattfinden. Diese Komplexe könnten folglich für die Kohlenhydratbindung nicht mehr verfügbar sein, folglich könnte dieser Aspekt die verminderte SP-A Funktion bei CF auch mit bewirken.

Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, wurden die BAL mit DNase (Desoxyribonuclease I) behandelt. In der folgenden Gelchromatographie konnte dann sogar eine Zunahme des ersten Peaks dargestellt werden. Dies könnte damit erklärt werden, dass nach Inkubation mit DNase große durch DNA zusammengehaltene SP-A Multimere in möglicherweise etwas kleinere, jedoch immer noch so große komplexe SP-A Oligomere zerlegt werden, dass diese in einem Peak eluiert werden. Dies ist in Einklang mit der Beobachtung, dass die Inkubation der BAL mit DNase vor der Durchführung der Affinitätschromatographie zu keiner signifikanten Verbesserung der Bindungsfähigkeit an Fucose führte.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von rhDNase wurde differenziert, ob eine in vivo Inhalationstherapie mit rhDNase (Pulmozyme®) einen Einfluss auf die DNA Konzentration in der BAL bzw. eine verbesserte Fucose-Bindungseigenschaften von SP-A hatte (n=11). Die mit rhDNase behandelten Patienten hatten keinen Unterschied in der DNA Konzentration der BAL im Vergleich zu den Patienten, die keine rhDNase Therapie hatten (n=12). Die Inhalationstherapie mit rhDNase bewirkte auch keine Verbesserung der SP-A Bindungseigenschaft zu Fucose.

Somit ist davon auszugehen, dass komplexe SP-A Oligomere wie bereits zuvor beschrieben (Palaniyar et al. 2004) DNA enthalten, jedoch hatten durch DNase induzierte Veränderungen der DNA-Längen in unseren Untersuchungen keinen Einfluss auf die SP-A Bindungsfähigkeit an Kohlenhydrate oder auf dessen Oligomerenstruktur. Dies steht im Einklang mit dem fehlenden Zusammenhang zwischen „SP-A non-binding“ und der DNA Konzentration der BAL. Wie erwartet konnte eine positive Korrelation zwischen der DNA Konzentration in der BAL und dem Alter der CF Patienten bestätigt werden. Innerhalb der CF Gruppe zeigte die DNA Konzentration der BAL eine positive Korrelation mit der Neutrophilenzahl der BAL, d.h. je höher die Neutrophilenzahl in der BAL, desto höher war auch die DNA Konzentration in der BAL der CF Patienten.

5. Zusammenfassung

Surfactant Protein A (SP-A) gehört zur Gruppe der C-Typ Lektine (Kollektine) und spielt beim angeborenen (innate) Immunsystem der Lunge eine wichtige Rolle. SP-A bindet über seine carboxyterminale Kohlenhydraterkennungsregion (CRD) kalziumabhängig an Kohlenhydrate auf der Oberfläche verschiedener Lungenpathogene und Wirtszellen. Eine chronische neutrophile Inflammationsreaktion kennzeichnet das bronchoalveoläre Milieu der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose (CF) und ist wahrscheinlich für das Fortschreiten der Erkrankung verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur und der Oligomerisierungsgrad von SP-A mittels Gelfiltrationschromatographie und die Funktion von SP-A an Kohlendhydrate zu binden, in der Fucose-Agarose-Affinitätschromatographie aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) von Patienten mit cystischer Fibrose untersucht. Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten mit rezidivierenden Bronchitiden.

Die Gesamtkonzentrationen an SP-A unterschieden sich bei beiden Gruppen nicht (ELISA).

Im Funktionsassay konnten wir demonstrieren, dass die Kohlenhydratbindungsfähigkeit von SP-A aus CF Lavagen signifikant vermindert war: aus der CF-BAL wurde im Durchschnitt nur 48 % vom SP-A an Fucose gebunden, bei den Kontrollen dagegen 92 %.

Diese Daten zur verminderten Kohlenhydratbindungsfähigkeit von SP-A bei CF lassen eine verminderte Funktion von SP-A bereits bei klinisch stabilen CF Patienten vermuten.

In der Gelfiltrationschromatographie zeigten die CF-BAL einen größeren Anteil an großen Oligomerenformen im Vergleich zu den Kontrollen. Sogar nicht-bindendes SP-A der CF Gruppe zeigte mehr komplexe Oligomeren im Vergleich zu den Kontrollen. Im Immunoblot waren die SP-A Formen in den nicht bindenden und bindenden Eluaten beider Gruppen gleich verteilt. Die Hauptbanden wurden bei 31-36 kD (Monomer) und 58-62 kD (Dimer) detektiert. Nur in 4 CF-Lavagen konnte SP-A mit einem sehr niedrigen Molekulargewicht (27 kD) in den nicht bindenden Fraktionen detektiert werden. Diese Lavagen hatten einen hohen Anteil an Neutrophilen (> 80 %). Die DNA-Konzentration in den CF-Lavagen war signifikant höher als in der Kontroll-Lavagen. Es bestand eine positive Korrelation zwischen der DNA Konzentrationen in der CF BAL und der Neutrophilenzahl.

Durch die höhere DNA-Konzentration kann die CRD Region mehr besetzt werden, so dass weniger SP-A für die Bindung an Kohlenhydraten zur Verfügung steht. Der hohe Anteil an

freier DNA in der CF-BAL könnte ein Faktor neben vielen anderen (IgG und andere Kohlenhydrate z.B. an Bakterien-, Pilzen-, Pollenoberflächen) sein, der die Selbstaggregation von SP-A fördert. Vermutlich lassen sich deswegen in der nativen CF BAL viele komplexe SP-A Formen darstellen. Des Weiteren spielt auch die Dominanz der Neutrophilen in der CF BAL eine Rolle, die auch bei klinisch stabilen CF Patienten nachweisbar war. Durch die erhöhte Aktivität der neutrophilen Proteasen in der CF Lunge kann es zur proteolytischen Degradation von SP-A kommen, die sich zum einen in der verminderten Kohlenhydrat-Bindungseigenschaften widerspiegeln kann, aber auch in Form von Degradationsprodukten als SP-A Fragmenten nachzuweisen war.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kohlenhydrat-Bindung von SP-A bei CF signifikant vermindert ist, auch wenn die Gesamtmenge an größeren Oligomeren nicht vermindert, sondern eher erhöht war. Diese SP-A Oligomere waren, im Gegensatz zu den Kontrollen, bei CF-Patienten zu einem größeren Teil funktionell inaktiv. Da SP-A ein Teil der humoralen Immunabwehr der Lunge ist, zeigen die Daten erstmals eine verminderte Funktionalität der Kollektin-abhängigen Erregerabwehr und zeigen damit einen weiteren Mechanismus auf, wie die Abwehr von Pathogenen in der Lunge von Patienten mit cystischer Fibrose beeinträchtigt ist. Surfactant Protein A Dysfunktion könnte folglich für das Fortschreiten der Lungenerkrankung bei CF mit verantwortlich sein.

6.1. EXKURS 1:

Surfactant Protein A (SP-A) Bindungseigenschaften mittels Affinitätschromatographie (Versuche mit Detergenz):

Etablierung der Methode und Darstellung mittels 1D-Gelelektrophorese und Immunoblot

6.1.1 Affinitätschromatographie mit Mannose-Agarose:

Die Affinitätschromatographie von Surfactant Protein A wurde nach der Methode von Haagsman (Haagsman et al. 1987-80) durchgeführt, um die Bindungseigenschaften von SP-A aus bronchoalveolären Lavagen von Patienten zu untersuchen. Dabei wurde die Bindungsaffinität von SP-A gegenüber Monosacchariden wie Mannose und Fucose untersucht. (s. Methoden 2.2.2).

Um die Reproduzierbarkeit dieser Methode nachzuweisen, wurde die Affinitätschromatographie zunächst mit rekombinantem humanem Surfactant Protein A (rhSP-A; BYK, Gulden) durchgeführt. SP-A bindet kalziumabhängig die Kohlenhydrate der Säulenmatrix, erst durch EDTA kann SP-A aus dieser Bindung gelöst und somit eluiert werden. Die einzelnen Eluate wurden nacheinander als 1 ml Fraktionen gesammelt. Die *Flow through*- und die *Calcium-wash*- Fraktionen enthalten demnach das nicht gebundene SP-A. Das SP-A aus diesen Fraktionen wird in den nachfolgenden Versuchen zusammengefasst als „**SP-A non-binding**“ bezeichnet. Die EDTA-wash Fraktionen enthalten das SP-A, das kalziumabhängig an dem Kohlenhydrat der Säulenmatrix gebunden war. Das SP-A aus diesen Fraktionen wird zusammengefasst als „**SP-A binding**“ bezeichnet.

Um zu sehen, ob es Unterschiede der Bindungseigenschaften von SP-A zu Mannose und Fucose gibt, wurden Affinitätschromatographien mit beiden Kohlenhydraten durchgeführt. Es wurde humanes rekombinantes SP-A (SPA/00-002, BYK, Gulden) mit einer Konzentration von 300 ng auf die Säule geladen. Anschließend wurden die einzelnen 1 ml Fraktionen entsalzt und mittels 1D- Gelelektrophorese unter denaturierten und reduzierten Bedingungen aufgetrennt, SP-A wurde dann im Immunoblot detektiert.

In den Affinitätschromatographieversuchen mit **Mannose** (n=3) konnte rekombinantes SP-A nur in den Flow through- und Calcium-wash-Fraktionen detektiert werden. In den EDTA-

wash-Fractionen, in denen an Mannose gebundenes SP-A eluiert werden sollte, konnten keine Banden detektiert werden. Folglich konnte das gesamte SP-A Volumen, das ursprünglich auf die Säule geladen wurde, nicht an Mannose binden. 50,7 % vom SP-A Gesamtvolumen wurden in der Flow through Fraktion detektiert, 49,3 % hingegen in den Calcium-wash Fraktionen. Die Banden wurden bei 35,8 kDa, 61,6 kDa, 104,1 und 138,3 kDa detektiert. Folglich konnten Monomere (1), Dimere (2), Trimere (3) und Tetramere (4) detektiert werden. (s. Abb.6.1)

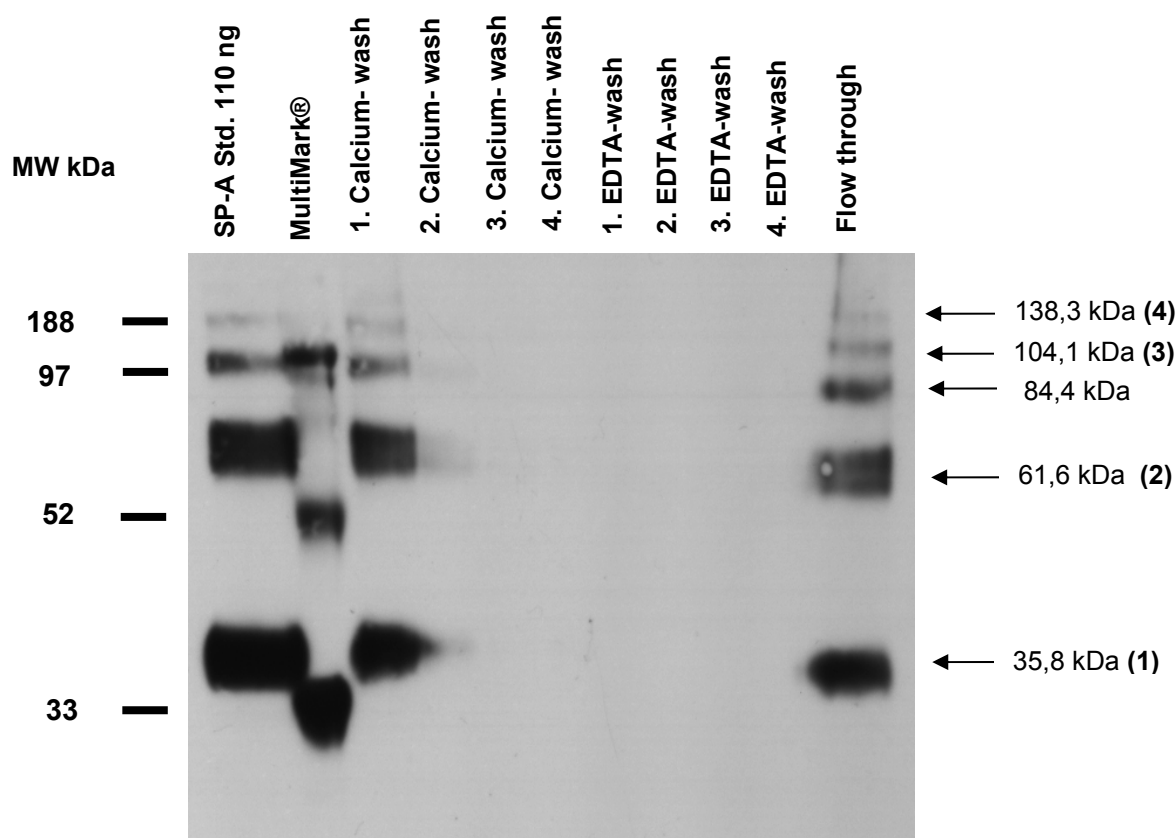


Abb. 6.1: Immunoblot von rhSP-A nach Mannose-Affinitätschromatographie.

300 ng rhSP-A (BYK Gulden) wurden auf die Mannose-Säule geladen. „*Flow through*“: beim Laden der Säule gesammelte Fraktion. *1.-4. Calcium-wash*: Säule wurde 4mal mit 3 mM Kalzium Puffer gewaschen. *1.-4. EDTA-wash*: Säule wird 4mal mit 5 mM EDTA Puffer eluiert. Die einzelnen Eluate wurden mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert analysiert. Als Standard wurden 110 ng native BAL derselben Probe verwendet.

(1) SP-A Monomer, (2) SP-A Dimer; (3) SP-A Trimer; (4) SP-A Tetramer

Es war kein Unterschied in der Bindungsaffinität von SP-A gegenüber Mannose zu sehen, wenn die Säule mehrmals hintereinander mit der Probenlösung geladen wurde. Sowohl nach fünfmaligem als auch nach zehnmaligem Laden der Säule mit derselben Probenlösung konnten keine Banden in den „EDTA-wash“ Fraktionen detektiert werden (Abb. 6.2).

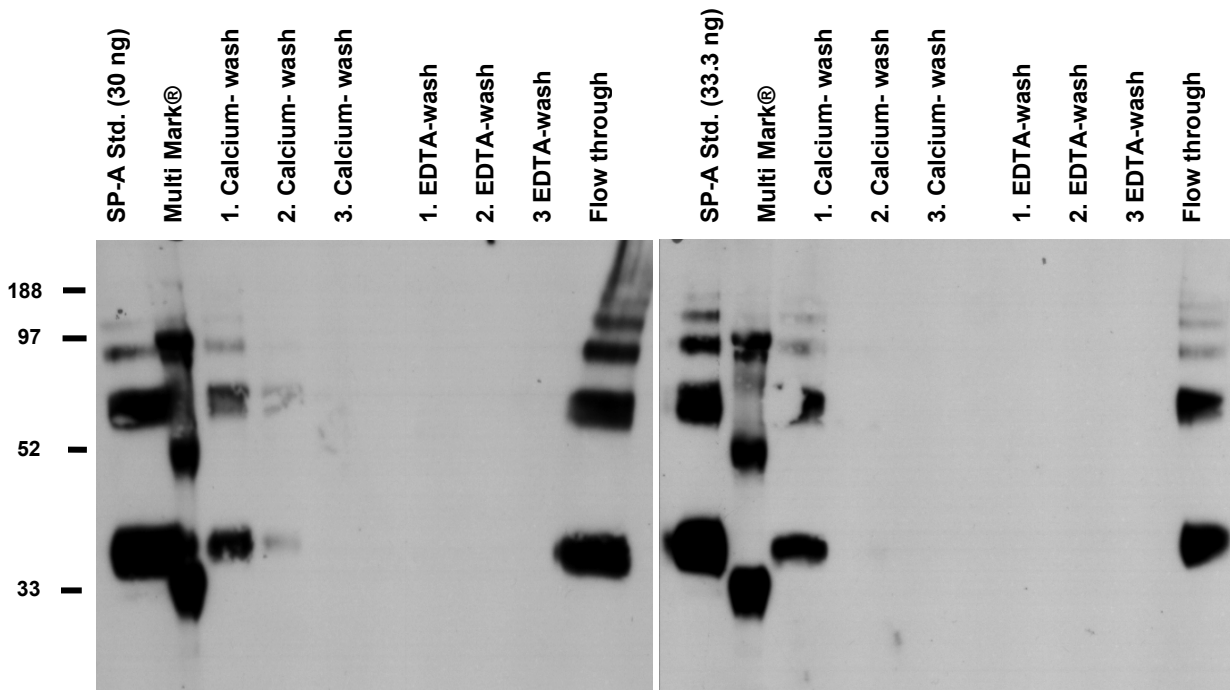


Abb. 6.2: Immunoblot von rhSP-A nach Mannose-Affinitätschromatographie: mehrmaliges Laden der Säule mit der Probenlösung

300 ng rhSP-A (BYK Gulden) wurden auf die Säule geladen. Die Säule wurde fünf Mal (links) und zehn Mal (rechts) mit selben Probenlösung geladen. Die einzelnen Eluate wurden anschließend mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert analysiert. Als Standard wurden 30 ng derselben nativen BAL Probe verwendet.

Folgerungen zu 6.1.1:

- rhSP-A kann Calcium-abhängig nicht an Mannose gebunden werden.
- Nicht Mannose bindendes SP-A („SP-A non-binding“) lag zu 42,1 % als Mono-, zu 37,4% als Di-, zu 15 % als Tri- und zu 8,2 % als Tetramer vor. Die einzelnen Oligomeren Formen konnten durch reduzierte Bedingungen voneinander separiert werden konnten.

6.1.2. Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose:

In den Affinitätschromatographie-Versuchen mit Fucose als Kohlenhydratkomponente der Säulenmatrix konnte nahezu das gesamte rhSP-A, das auf die Säule geladen wurde, in den EDTA-wash-Fraktionen detektiert werden. Nur ein geringer Anteil konnte in der Flow through-Fraktion detektiert werden (Abb. 6.3). Demzufolge konnten 96 % vom SP-A Gesamtvolumen, das auf die Säule geladen wurde, an Fucose binden.

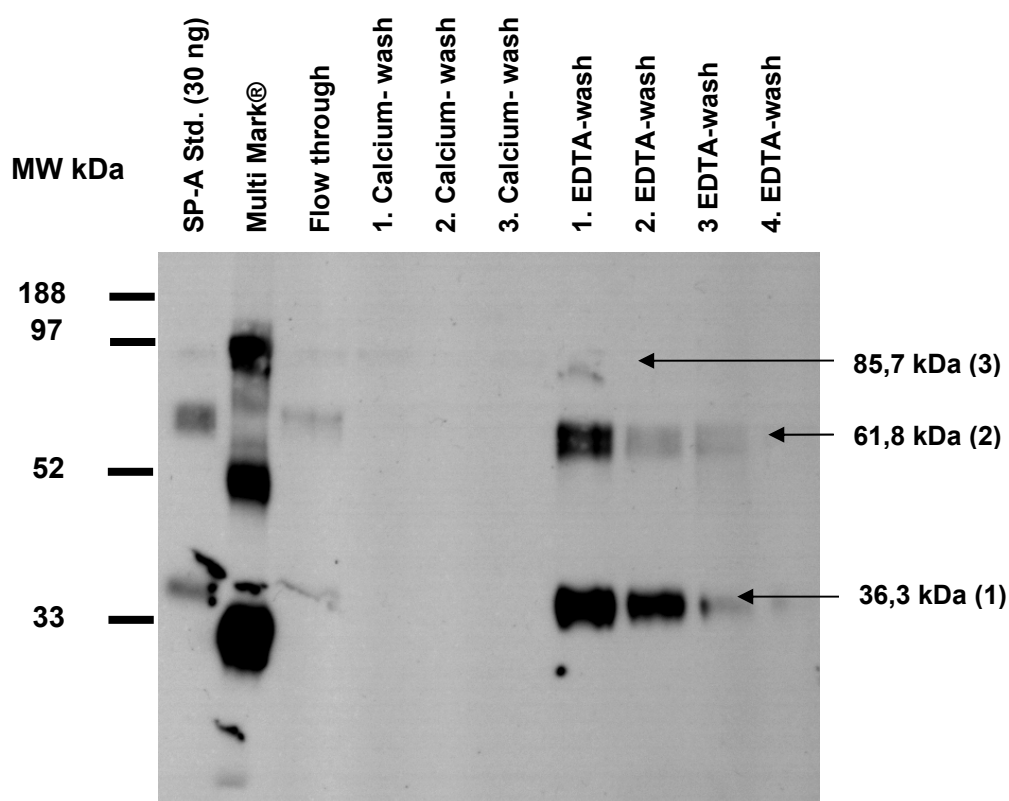


Abb. 6.3: Immunoblot von rhSP-A nach Fucose-Affinitätschromatographie

Es wurde rhSP-A (BYK Gulden) verwendet. 66,6 ng hrSP-A wurden auf die Säule geladen. Anschließend wurden die einzelnen Eluate über NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert analysiert. Als Standard wurden 33,3 ng derselben Probe verwendet. Das an Fucose gebundene SP-A wird bei 36,3, 61,8 und 85,7 kDa eluiert und somit liegt es in folgenden oligomeren Formen vor:

(1) SP-A Monomer, (2) SP-A Dimer; (3) SP-A Trimer;

6.1.3 Inkubation von rhSP-A und Fucose-Agarose:

Um zu untersuchen, ob die Bindungsaffinität von SP-A zu Fucose durch eine längere Kontaktzeit zwischen Probenlösung und Fucose sich verbessern lässt, wurde die Probenlösung zusammen mit der aufbereiteten Fucose-Agarose Säulenmatrix über 1 bzw. 3 Stunden bei Zimmertemperatur auf dem Laufrad inkubiert (n=2). Anschließend wurde das Gemisch aus Fucose-Agarose Medium und Probenlösung in die Mobicol-Säule geladen, wie gewohnt eluiert und in der 1D-Gelelektrophorese dargestellt (s. Abb. 6.4)

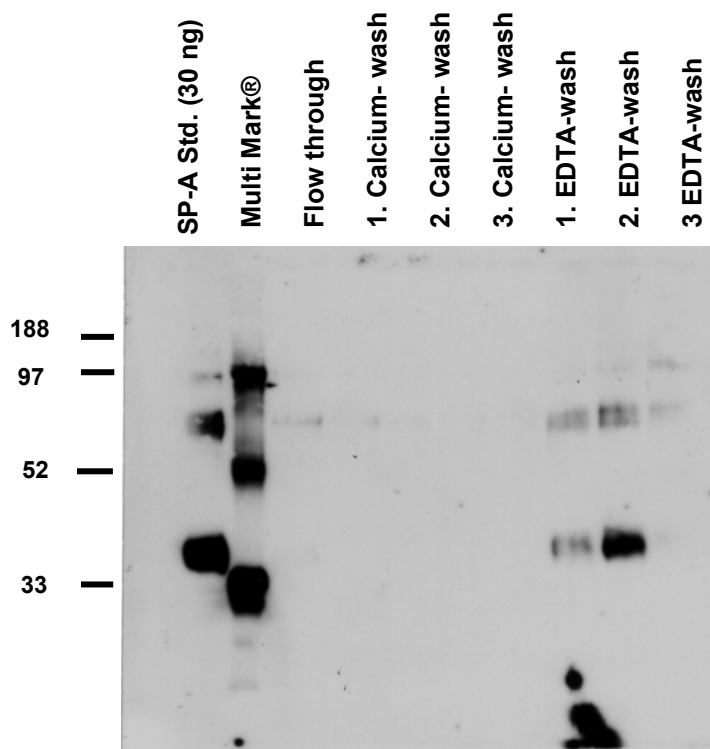


Abb. 6.4: Immunoblot von rhSP-A nach Fucose-Affinitätschromatographie: Abhängigkeit der Inkubationsdauer der Probe mit dem Fucose-Agarose Medium

Die Probenlösung wurde zusammen mit dem Fucose-Agarose Medium bei Zimmertemperatur jeweils 1 Stunde auf dem Laufrad inkubiert. Anschließend wurde die Fucose-Affinitätschromatographie nach Schema durchgeführt. Die einzelnen Eluate wurden mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer unter denaturierten und reduzierten Bedingungen analysiert. Als Standard wurden 30 ng derselben Probe verwendet.

Insgesamt ergab die Inkubation von Probenlösung und Fucose-Agarose Medium über 1 bzw. 3 Stunden keinen wesentlichen Unterschied bezogen auf die Bindungsaffinität von SP-A zu Fucose im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen. Ca. 94 % vom SP-A Gesamtvolumen wurden in der „EDTA-wash“ Fraktion detektiert, 6 % hingegen in der „Flow through“ Fraktion. Die SP-A Banden wurden bei 39,4 kDa, 77,1 kDa und 112,4 kDa detektiert. Folglich konnten wieder Monomere, Dimere und Trimere dargestellt werden.

Folgerungen zu 6.1.2-6.1.3:

- rhSP-A kann Calcium-abhängig an Fucose binden:
96 % vom SP-A Gesamtvolumen, das auf die Säule geladen wurde, konnte an Fucose binden.
- An Fucose bindendes SP-A („SP-A binding“) lag zu 55,4 % als Mono-, zu 35,3 % als Di- und zu 5,3 % als Trimer vor. Die einzelnen Oligomeren Formen konnten durch reduzierte Bedingungen voneinander separiert werden konnten.
- Eine Verlängerung der Inkubationszeit von Probenlösung und Fucose-Agarose-Medium bringt keine Verbesserung der Bindungsaffinität von SP-A zu Fucose.

6.1.4. Bestimmung der minimalen Bindungskapazität der Fucose-Agarose-Säule

Im folgenden Versuch wurde diejenige SP-A Konzentration ermittelt, die mindestens notwendig war, damit SP-A an Fucose binden und aus dieser Bindung wieder eluiert werden konnte und anschließend im Immunoblot noch zu detektieren war. Die Fucose-Säule wurde mit rhSP-A geladen mit jeweils 80 ng (1), 50 ng (2) und 30 ng (3) (n=2). Im Immunoblot konnten bei 30 ng keine Banden detektiert werden (s. Abb.6.5).

Folglich ist eine Mindestkonzentration von 50 ng in der Probenlösung notwendig, damit SP-A an Fucose in der Affinitätschromatographie binden kann und anschließend eine Detektion im Immunoblot auch noch möglich ist.

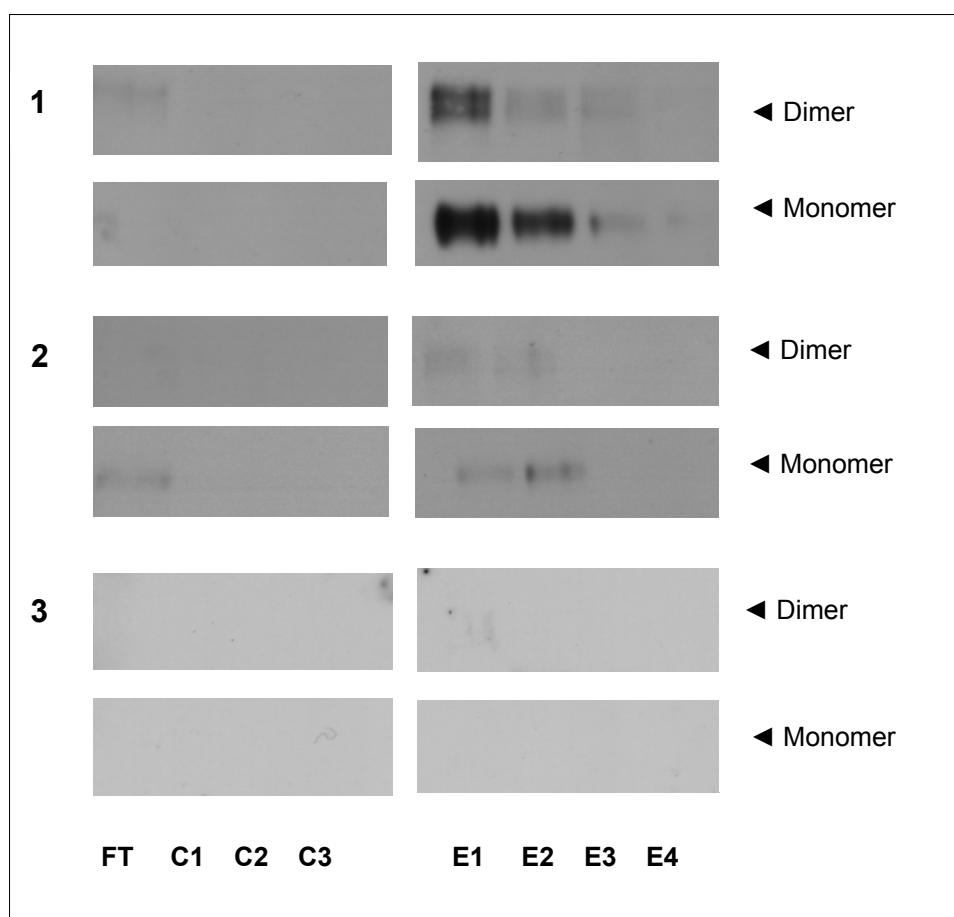


Abb. 6.5: Immunoblot von rhSP-A nach Fucose-Affinitätschromatographie: Bestimmung der minimalen Bindungskapazität der Fucose-Säule.

Es wurde rhSP-A (BYK Gulden) verwendet. Es wurden auf die Fucose-Säule jeweils: 1: 80 ng; 2: 50 ng und 3: 30 ng hrSP-A geladen. FT (Flow through), C1-3 (Calcium-wash) und E1-4 (EDTA-wash) Eluate werden mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer unter denaturierten und reduzierten Bedingungen analysiert.

Werden 30 ng rhSP-A verwendet, können keine Banden mehr detektiert werden.

6.1.5 Bestimmung der maximalen Bindungskapazität der Fucose-Agarose-Säule

Um die maximale Bindungsaffinität von nativem humanem SP-A zu Fucose zu untersuchen, wurden Säulenchromatographien mit Fucose durchgeführt, die mit einer bronchoalveolären Lavage eines Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose (PAP) geladen wurden. Für folgende Versuche wurde eine PAP Lavage ausgewählt, da bei dieser Erkrankung die SP-A Konzentration in der BAL sehr hoch ist. In diesem Fall betrug die SP-A Konzentration 13882 ng/ml und das Gesamtprotein betrug 324,3 µg/ml. Beim folgenden Versuch wurden die Fucose-Säulen mit einer aufsteigenden SP-A Konzentration geladen: bei 200 ng begonnen und bis zu einer Konzentration von 5000 ng fortgeführt.

Die erste Fraktion, die beim Laden gesammelt wurde (Flow through 1), wurde anschließend auf eine zweite Fucose-Säule aufgetragen, dabei wurde beim Laden dieser zweiten Säule der „Flow through 2“ (**FT 2**) gesammelt. Anschließend wurde die zweite Fucose-Säule mit EDTA Puffer ausgewaschen (**E-FT 2**). Folglich wurde diejenige SP-A Konzentration, die nicht an der ersten Fucose-Säule binden konnte (Flow through 1), in der **E-FT 2** Fraktion eluiert. Die erste Fucose Säule wurde ebenfalls mit EDTA Puffer ausgewaschen (**E-1**). Die **E-1** Fraktion, beinhaltete diejenige SP-A Menge, die beim Laden der ersten Säule an Fucose binden konnte.

Alle Eluate wurden unter denaturierten und reduzierten Bedingungen in der 1D-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunoblot wurden die SP-A Banden detektiert. (s. Abb. 6.6).

Wurde die Fucose-Säule mit 200ng, 400 ng, 600 ng, 800 ng, 1000 ng und 1200 ng SP-A geladen, so wurden SP-A Banden vorwiegend in den E-1 Fraktionen detektiert. Folglich konnte nahezu die gesamte SP-A Konzentration, die auf die Säule geladen wurde, an Fucose binden.

Wurde die Fucose-Säule mit 1400 ng und 3000 ng SP-A geladen, so ließen sich Banden in den **FT 2** und **E-FT 2** Fraktionen detektieren, diese entsprachen derjenigen SP-A-Konzentration, die an Fucose nicht binden konnte. Bei dem Versuch mit 1400 ng wurden ca. 93,4 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose gebunden (**E-1** Fraktion) hingegen wurden 5,6 % nicht gebunden.

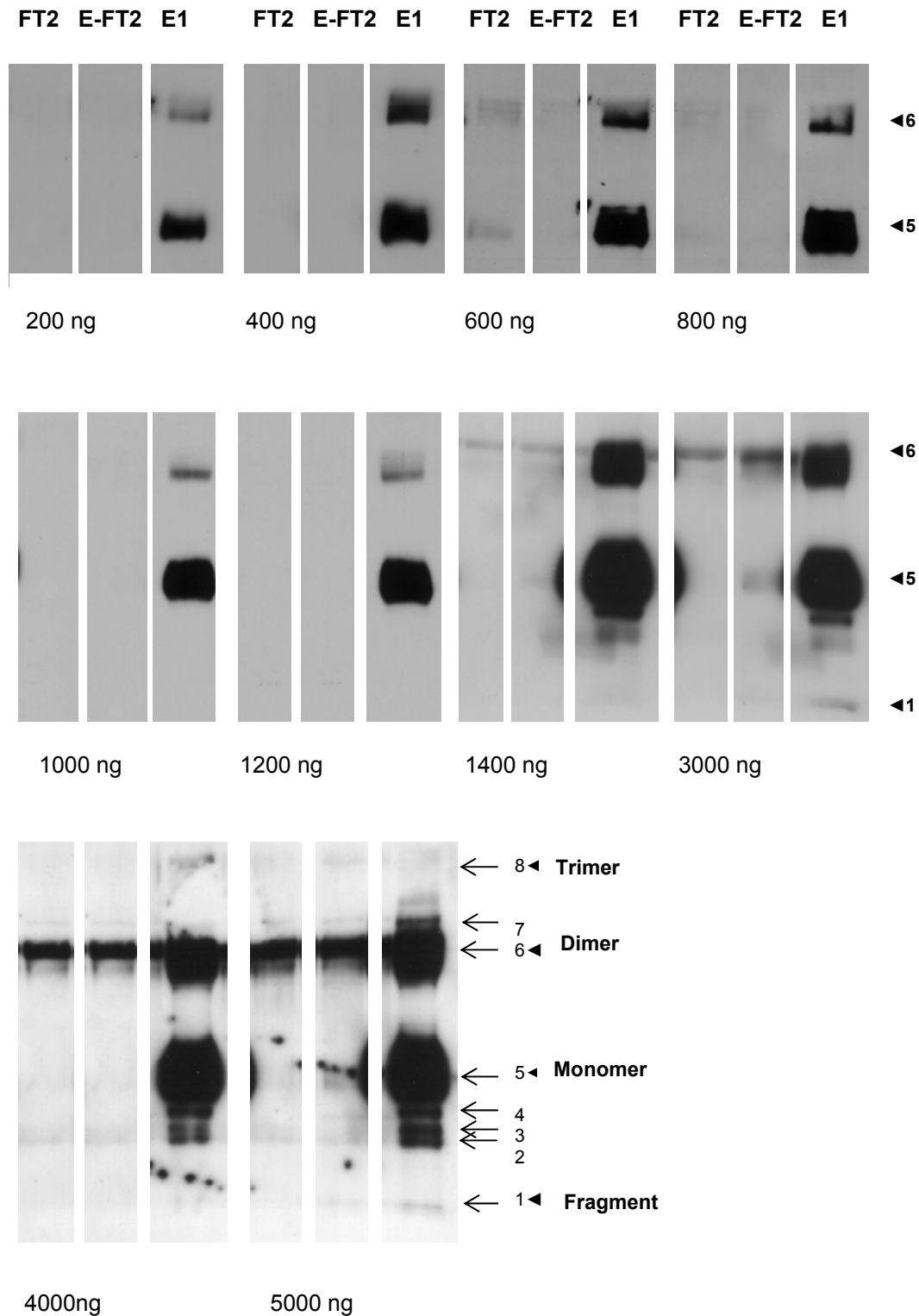


Abb. 6.6: Immunoblot von SP-A einer PAP-BAL nach Fucose-Affinitätschromatographie: Bestimmung der maximalen Bindungskapazität der Fucose-Säule.

SP-A wurde mit steigender Konzentration auf die Fucose-Säule geladen (von 200 ng bis 5000 ng).

Beim Laden der Säule wurde Flow-through 1 Fraktion auf eine zweite Säule geladen, dabei wurde die Flow-through 2 (FT2) gesammelt und dann mit EDTA Puffer eluiert (E FT2). Die erste Säule wurde genauso mit EDTA Puffer eluiert (E1). Die Eluate wurden mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer unter denaturierten und reduzierten Bedingungen analysiert.

(1): 15,7 kDa, (2): 27,1 kDa, (3): 30,5 kDa, (4): 32,5 kDa, 5: 36,6 kDa, (6): 63,1 kDa, (7): 88,2 kDa, (8) 110 kDa

Bei dem Versuch mit 3000 ng wurden 82,4 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose gebunden und 11,4 % wurden in den **FT 2** und **E-FT 2** Fraktionen detektiert und waren somit nicht an Fucose gebunden.

Wurde die Fucose-Säule mit 4000 ng und 5000 ng SP-A geladen, so waren die Banden in den **FT 2** und **E-FT 2** Fraktionen stärker. Bei dem Versuch mit 4000 ng wurden 80,8 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose gebunden (**E-1** Fraktion), 19,2 % wurden nicht gebunden. Bei dem Versuch mit 5000 ng wurden 76 % vom SP-A Gesamtvolumen an Fucose gebunden und 24 % wurden in den **FT 2** und **E-FT 2** Fraktionen detektiert und waren somit nicht an Fucose gebunden.

Die SP-A Banden wurden bei 36 kDa, 63 kDa und 110 kDa detektiert. Folglich konnten wieder SP-A Monomere, Dimere und Trimere dargestellt werden. Bei steigender SP-A Konzentration konnten zunehmend Banden im unteren Molekulargewichtsbereich detektiert werden (s. Abb 3.15 Bild unten). Es konnte hier auch eine Bande bei ca. 16 kDa detektiert werden, die vermutlich einem SP-A Fragmenten entsprechen könnte.

Aus diesen Ergebnissen folgt, dass mit der SP-A Konzentration ≥ 1400 ng der Probenlösung, die auf die Fucose-Säule geladen werden soll, nicht die gesamte Menge von SP-A an Fucose gebunden werden kann.

Damit ist zu erklären, dass bis zur o.g. SP-A Konzentration im vorliegenden Versuchsaufbau eine volle Ausschöpfung der Fucosebindungsstellen für SP-A stattfinden kann.

6.1.6 Säulenchromatographie ohne Fucose als Kontrollversuch:

Um eine unspezifische Bindung von SP-A an der Säulenmatrix auszuschließen, wurde eine Mobicol-Säule nur mit Sepharose geladen. Die Säulenchromatographie wurde nach gewohntem Schema mit 100 ng rh SP-A durchgeführt.

SP-A konnte nur in der *Flow through* Fraktion und in der 1. *Calcium-wash* Fraktion detektiert werden. In den *EDTA-wash* Fraktionen konnten keine Banden detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass SP-A unspezifisch Sepharose und somit die Säulenmatrix alleine d.h. in Abwesenheit von Fucose nicht binden kann (s. Abb. 6.7).

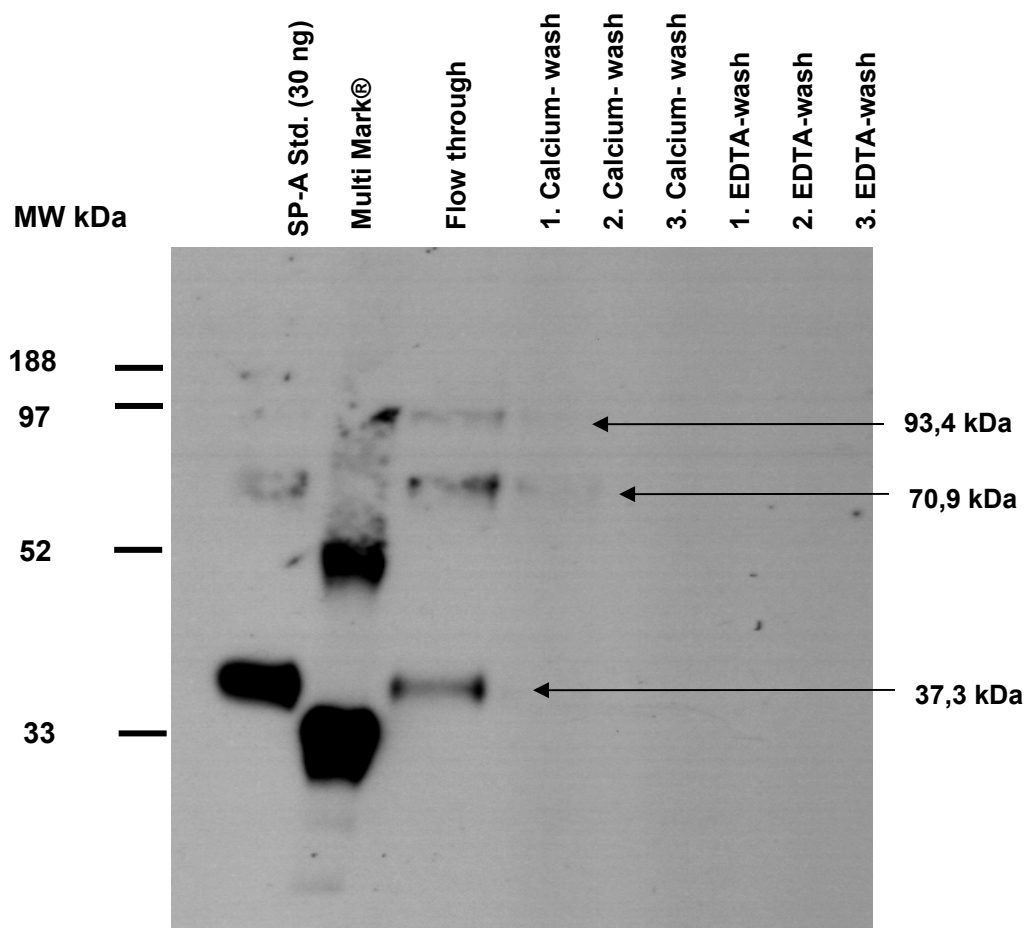


Abb. 6.7: Immunoblot von rhSP-A nach Affinitätschromatographie mit Sepharose ohne gebundebem Kohlenhydrat an der Säulenmatrix.

Es wurde rh SP-A (BYK Gulden) auf die Säule geladen. Eluate werden mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer unter denaturierten und reduzierten Bedingungen analysiert. Als Standard wurden 30 ng derselben Probe verwendet.

74,9 % vom SP-A Gesamtvolumen wurden in der *Flow through* Fraktion detektiert, 25,1 % in der 1. *Calcium-wash* Fraktion. In den EDTA Fraktionen konnte kein SP-A detektiert werden.

Folgerungen zu 6.1.4-6.1.6:

- Die minimale Bindungskapazität der Fucose-Agarose-Affinitätschromatographie ist bei einer SP-A Konzentration von 50 ng in der BAL Probe gegeben.
- Die maximale Bindungskapazität der Fucose-Agarose-Affinitätschromatographie ist bei der SP-A Konzentration von ≤ 1400 ng der BAL Probe gegeben.
- Keine unspezifische Bindung von SP-A an die Säulenmatrix (Sephrose).

6.1.7 Inkubation der BAL mit N-Glykosidase F (NGF)

Um N-gebundene Oligosaccharide vom SP-A Protein zu lösen wurden bronchoalveoläre Lavagen mit dem rekombinanten N-Glykosidase F Enzym bei 37°C, 4, 6, 12 und 24 Stunden inkubiert. Das im Inkubationspuffer enthaltene 25 mM EDTA diente dazu Proteasen aus der BAL zu hemmen und divalente Kationen-abhängige Bindungen zu lösen. Zum anderen sollte die Deglykosylierung der SP-A Proteine dazu führen, sie besser unter nativen Laufbedingungen in der Gelelektrophorese darzustellen und so auch größere SP-A Oligomere zu detektieren.

Die Versuche wurden mit der BAL einer PAP Probe (wegen der hohen SP-A Konzentration) durchgeführt. 5 µg Gesamtprotein dieser BAL wurden jeweils 4, 8, 16 und 24 Stunden mit N-Glykosidase F inkubiert. Anschließend wurden SP-A unter nativen Laufbedingungen, d.h. unter nicht-denaturierten und nicht-reduzierten Bedingungen und unter denaturierten und nicht-reduzierten Bedingungen dargestellt (s. Abb. 6.8).

Unter **nativen Laufbedingungen** ließen sich die SP-A Proteine bei ca. 680 kDa detektieren, kleine Oligomere konnten nicht dargestellt werden. Hier brachte die Deglykosylierung keine Verbesserung der Darstellung, sodass diese Methode nicht weiter verfolgt wurde (s. Abb. 6.8, linkes Bild).

In der 1D-Gelelektrophorese unter **denaturierten und nicht-reduzierten Bedingungen** ließen sich die SP-A Proteine erst ab ca. 50 kDa detektieren. Zwar ließen sich die einzelnen Polymere besser darstellen, Monomere konnten allerdings nicht differenziert werden (s. Abb. 6.8, rechtes Bild).

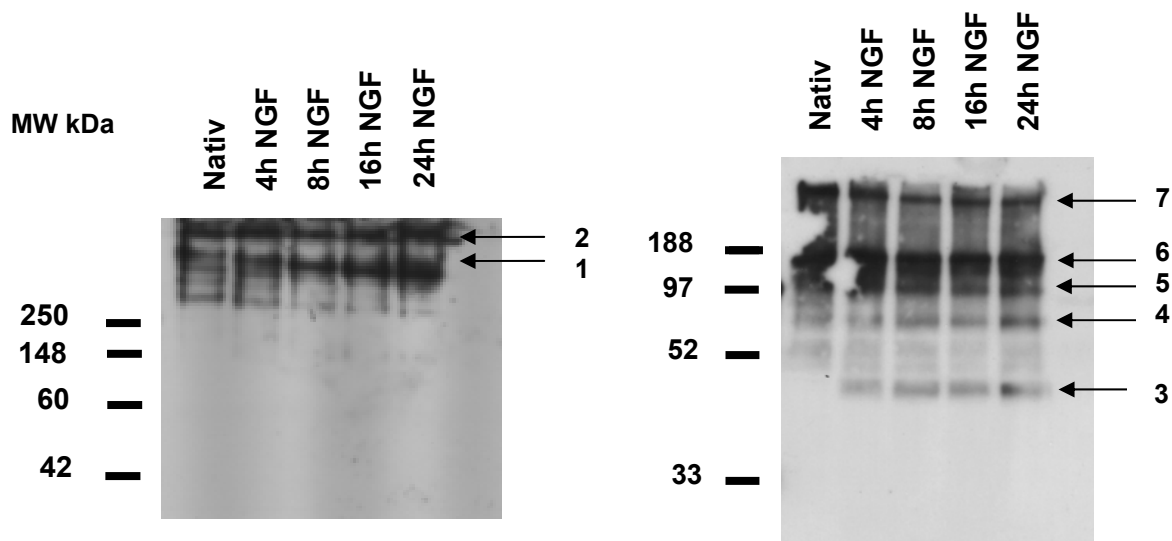


Abb. 6.8: Immunoblot von SP-A nach NuPAGE® Gelelektrophorese unter *nativen* Laufbedingungen (*nicht-denaturiert und nicht- reduziert*) links im Vergleich zu *denaturiert und nicht-reduziert rechts*. 5 µg Gesamtprotein einer PAP Lavage wurden bei 37°C mit N-Glykosidase F jeweils 4h, 8h, 16h und 24h inkubiert, dieselbe Probe (Nativ) wurde nicht inkubiert als Kontrolle aufgetragen.

Folgende Reduktion des Molekulargewichts durch Inkubation mit NGF wurde gemessen:

- (1) 680 kD (Nativ) und 622 kD (24h NGF) (2) 1413 kD (Nativ) und 1294 kD (24h NGF)
- (3) 51 kD (nativ) und 43 kD (24hNGF) (4) 67 kD (nativ) und 65kD (24h NGF)
- (5) 100 kD (nativ) und 90 kD (24h NGF) (6) 145 kD (nativ) und 125 kD (24h NGF)
- (7) 350 kD (nativ) und 311 kD (24h NGF)

Ferner wurden Proben von derselben Inkubationszeit unter **nicht-reduziert** und **reduzierten Bedingungen** im Vergleich dargestellt (n=2) (s. Abb. 6.9). Mit steigender Inkubationsdauer mit dem Enzym N-Glykosidase F konnte ein stärkerer Abfall des Molekulargewichts bewirkt werden. Die zusätzliche Reduktion mittels Dithiothreitol bzw. DTT zeigte allerdings kein weiteres Absinken des Molekulargewichts. Die Deglykolysierung der Proben bewirkte eine Aufspaltung der Banden im Vergleich zur nicht mit NGF inkubierten Proben. Die alleinige Reduktion der nativen Probe führt - genauso wie das Inkubieren mit NGF – nicht nur zur Reduzierung des Molekulargewichts sondern auch zur Aufspaltung der Banden im niedrigen Molekulargewichtsbereich. Die erste Bande bei der nativen reduzierten Probe wird bei 30,3 kDa und die zweite bei 34,4 kDa detektiert. Diese Molekulargewichte entsprechen den Molekulargewichten nach einer 24-stündigen Inkubation mit N-Glykosidase F.

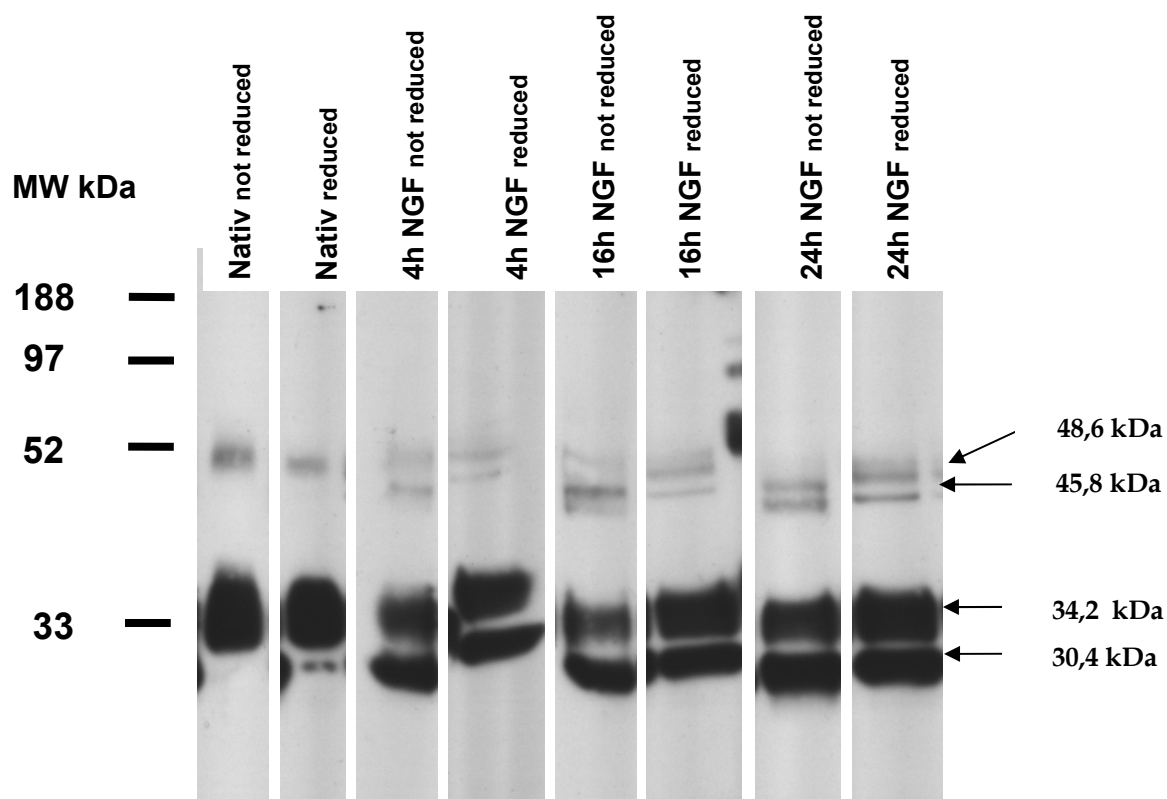


Abb.. 6.9: Immunoblot von SP-A nach Inkubation mit NGF: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert, nicht-reduzierte und reduzierte Proben im Vergleich.

5 µg Gesamtprotein einer PAP Lavage Probe wurden bei 37°C mit N-Glykosidase F jeweils 4h, 16h und 24h inkubiert, dieselbe Probe (Nativ) wurde nicht inkubiert als Kontrolle aufgetragen. Die einzelnen Proben wurden durcheinander aufgetragen, in der Abbildung allerdings geordnet, um eine Verfälschung durch den Lauf der Proben im Gel auszuschließen. NGF bewirkt die größte Reduktion des Molekulargewichts nach 24 h Inkubation, auffällig die stärkere Aufspaltung der Banden im Vergleich zur nativen Probe.

Folgerungen zu 6.1.7:

- NGF bringt die größte Reduktion des Molekulargewichts nach 24 h Inkubation.
- Die Inkubation der BAL mit NGF bringt keinen Vorteil bei der Darstellung der SP-A Oligomere in der 1D Gelelektrophorese.

6.1.8 Versuche mit Mannose-Säulenchromatographie und BSA

Um unspezifische Bindungsstellen der Säulenmatrix bei der Säulenchromatographie abzudecken, wurde Bovines Serum Albumin (BSA) der Probenlösung vor dem Laden der Säule zugefügt. Es wurden Versuche mit 0,1 % und 1 %-igen BSA-Lösung durchgeführt. Die Säulenchromatographie wurde wie gewohnt durchgeführt.

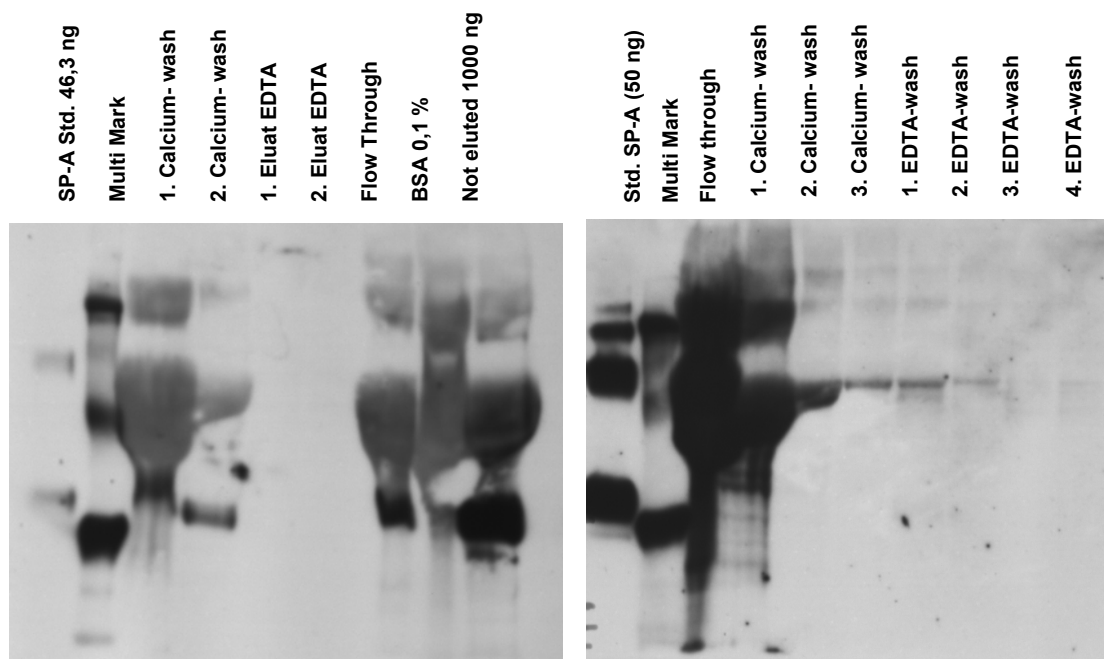


Abb. 6.10: NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer, denaturiert und reduziert; nach Mannose-Affinitätschromatographie. PAP Lavageprobe mit einer SP-A Konzentration von 13989 ng/ml und einer Gesamtkonzentration von 247 µg/ml. Es wurden jeweils 500 ng auf die Säule geladen. Der Probenlösung mit **0,1 % BSA** (linkes Bild) bzw. **1 % BSA** (rechtes Bild). Die gesammelten Fraktionen der Säulenchromatographie wurden in der Gelelektrophorese aufgetrennt. 1000 ng SP-A mit 0,1 % BSA Zusatz wurden nativ als Positivkontrolle aufgetragen (Not eluted). Als Negativkontrolle wurde 0,1 % BSA in Calciumpuffer aufgetragen.

Das zur Probenlösung zugefügte 0,1 % bzw. 1 % BSA verschlechterte die Darstellung im Immunoblot (s. Abb. 6.10). Die Banden waren teilweise nicht genau voneinander abzugrenzen. Durch den Zusatz von BSA zur Probenlösung ließ sich die Säulenchromatographie nicht verbessern. Die Bindungsaffinität von SP-A an Mannose-Agarose blieb durch den Zusatz von BSA unverändert d.h. weiterhin konnte SP-A an Mannose nur geringfügig binden.

Folgerungen zu 6.1.8:

- BSA Zusatz verändert die Bindung von SP-A an die Mannose-Säule nicht.

6.2. EXKURS 2:

Makromolekulare Organisation mittels Gelfiltrationschromatographie

6.2.1 Affinitätschromatographie mit Detergenz:

Analyse der SP-A Struktur von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ mittels Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA)

Ergänzend zu den Versuchen im Ergebnisteil 3.4.2 wurde die Affinitätschromatographie mit Fucose-Agarose mit Detergenz durchgeführt und anschließend wurden die „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ Fraktionen mittels Gelfiltrationschromatographie untersucht. Interessant war es, zu überprüfen, ob auch unter Detergenz sich beide Gruppen bezüglich ihrer komplexen oligomeren Formen unterscheiden.

a) Affinitätschromatographie mit Detergenz

Hierzu wurde nach gewohntem Schema die Affinitätschromatographie mit der Fucose-Agarose-Säule mit 1 ml CF BAL (n=4) durchgeführt. Anschließend wurden die Flow-through und die 1.-3. Calcium-wash Fraktionen zusammengefasst als Pool 1 (entspricht „SP-A non-binding“) und die 1.-3. EDTA-wash Fraktionen als Pool 2 (entspricht „SP-A binding“) zusammengefasst. Pool 1 und Pool 2 wurden dann über die Gelfiltrationschromatographie der Proteingröße nach aufgetrennt und anschließend im Dot-Blot Assay wurde der SP-A Gehalt bestimmt.

Da bei den Fucosesäule-Eluaten (Pool 1 und Pool 2) Detergenz vorhanden war, ließ sich das Dot-Blot Assay nur mit Zusatz von 1 % SDS zum TBS Puffer (zum Waschen der Wells und zum Equilibrieren der Membran s. Methodenteil) durchführen.

In Abb. 6.11 ist die Strukturverteilung von SP-A bei Pool 1 und Pool 2 der CF Lavagen (n=4) im Vergleich dargestellt. Der SP-A Gehalt der einzelnen Fraktionen ist als Prozent vom Gesamt SP-A Gehalt jeweils der Pool1 bzw. Pool 2 angegeben.

Die oligomere Verteilung von SP-A innerhalb der „SP-A non-binding“ und der „SP-A binding“ Gruppe unterscheiden sich nicht voneinander.

Als Vergleich wurden mit Lavagen der Kontrollgruppe (n=5) wie beschrieben verfahren. In Abb. 6.13 wurden den CF Lavagen den Kontroll Lavagen gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, genau wie bei den CF-Lavagen, dass die SP-A oligomeren Formen sich ebenfalls nicht unterscheiden.

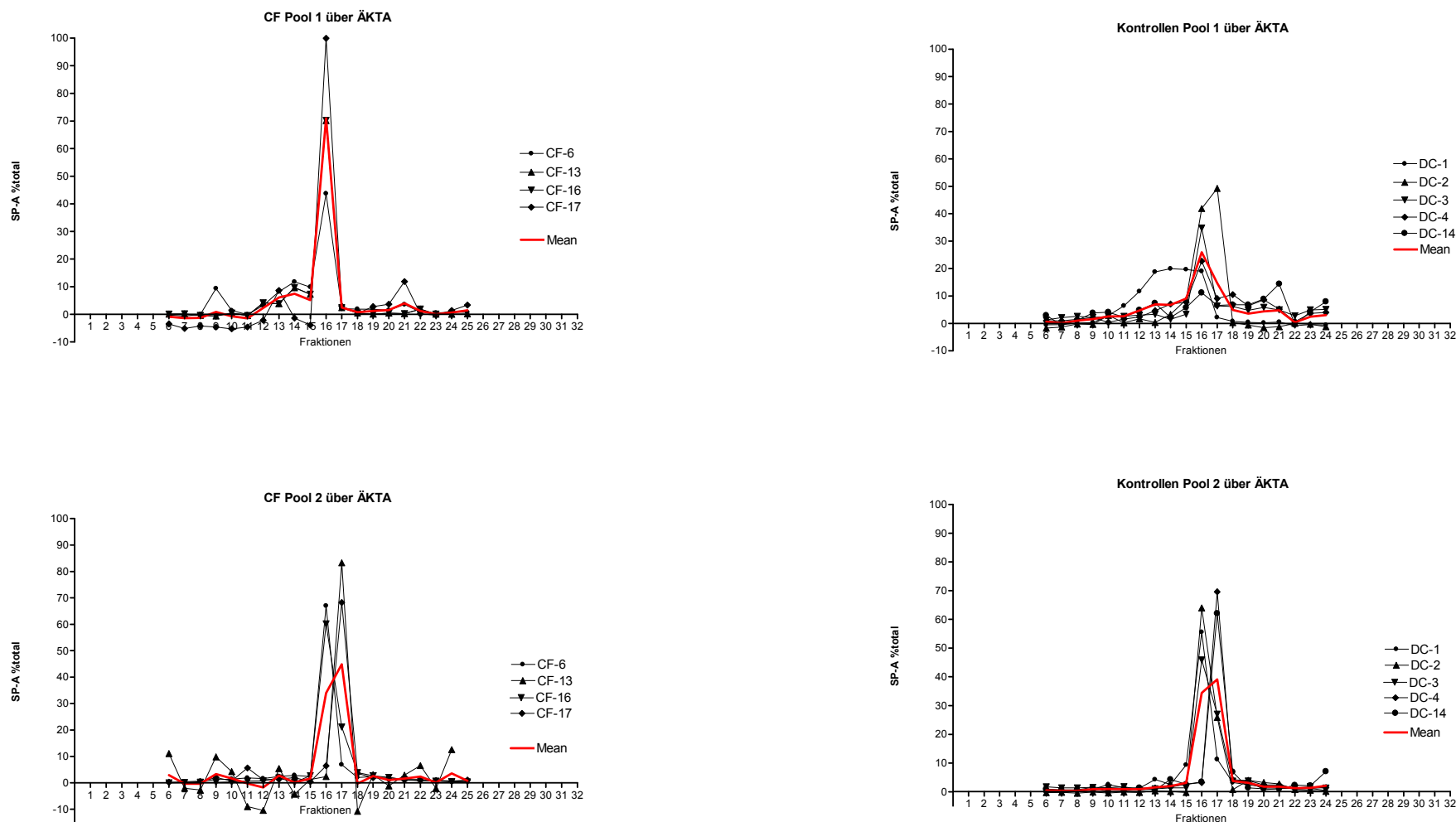


Abb. 6.11: Verteilung der SP-A oligomeren Formen: Unterschiede zwischen „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ bei CF (links) und Kontrollen (rechts)

1 ml nativer BAL (n=4) wurde mittels Fucose Affinitätschromatographie aufgetrennt, dabei enthielt das Elutionspuffer kein Detergenz:

die „SP-A non-binding“ Eluate wurden zu Pool 1 und die „SP-A binding“ Eluate zu Pool 2 zusammengefasst. Anschließend wurden jeweils Pool 1 und Pool 2 einer BAL Probe über die Gelfiltrationschromatographie (ÄKTA) aufgetrennt um die Verteilung der SP-A Oligomeren Formen darzustellen.

Die rote Kurve stellt den Mittelwert dar. **Links:** CF BAL; **rechts:** Kontrollen BAL

Oben: Pool 1 (entspricht „SP-A non-binding“) und Unten: Pool 2 der CF BAL (entspricht „SP-A binding“)

Im Vergleich zu den Versuchen mit Detergenz fehlt in der Gelfiltrationschromatographie hier der erste Peak, der sonst sowohl bei der nativen BAL als auch nach Durchführung der Fucose-Agarose Affinitätschromatographie zu sehen war (Ergebnisse Abb. 3.12 und Abb. 3.13). Ein Problem bei diesem Versuchsaufbau könnte die Zugabe von SDS im Dot-Blot assay sein. SDS löst nicht-kovalente Bindungen und kann dadurch zur Entfaltung des SP-A Proteins führen. Dadurch kann sowohl bei „SP-A non-binding“ als auch bei „SP-A binding“ in der Gelfiltrationschromatographie kein erster Peak dargestellt werden, weil durch die SP-A Antikörper die komplexen großen Oligomere, die durch SDS entfaltet wurden, nicht erkannt werden können.

Folgerungen zu 6.2.1:

- Mittels Fucose-Affinitätschromatographie lässt sich SP-A in „**SP-A non-binding**“ und „**SP-A binding**“ eluieren. Die Affinitätschromatographie mit Fucose wird mit Detergenz durchgeführt.
- Die Makromolekulare Anordnung von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ wird mittels Gelelektrophorese dargestellt:
 - „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ zeigen eine ähnliche Verteilung
- Die Makromolekulare Anordnung von „SP-A non-binding“ und „SP-A binding“ bei der CF Gruppe unterscheidet sich nicht von den Kontrollen.

6.2.2 Gelfiltrationschromatographie nativer BAL mit Zugabe von Detergenz

Um zu überprüfen, ob Detergenz die großen komplexen Formen von SP-A löst und dadurch zu Depolymerisierung von SP-A führt, wurde zur nativen bronchoalveolären Lavage von CF (n=2) und Kontrollen (n=2) Triton X-100 (0,1 %) zugefügt und anschließend die Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Der SP-A Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde über Dot-Blot Assay bestimmt.

Bei den untersuchten BAL Proben zeigte sich, dass der erste Peak v.a. bei den CF BAL etwas kleiner ist als bei der nativen Lavage ohne Detergenz, allerdings ist dieser Peak weiterhin vorhanden (s. Abb. 6.12). Hieraus könnte der Schluss gezogen werden, dass Detergenz die Bildung von großen komplexen Formen von SP-A (18-mere und höhere Formen) bzw. auch Agglutination von SP-A Oligomeren reduzieren aber nicht völlig auflösen kann.

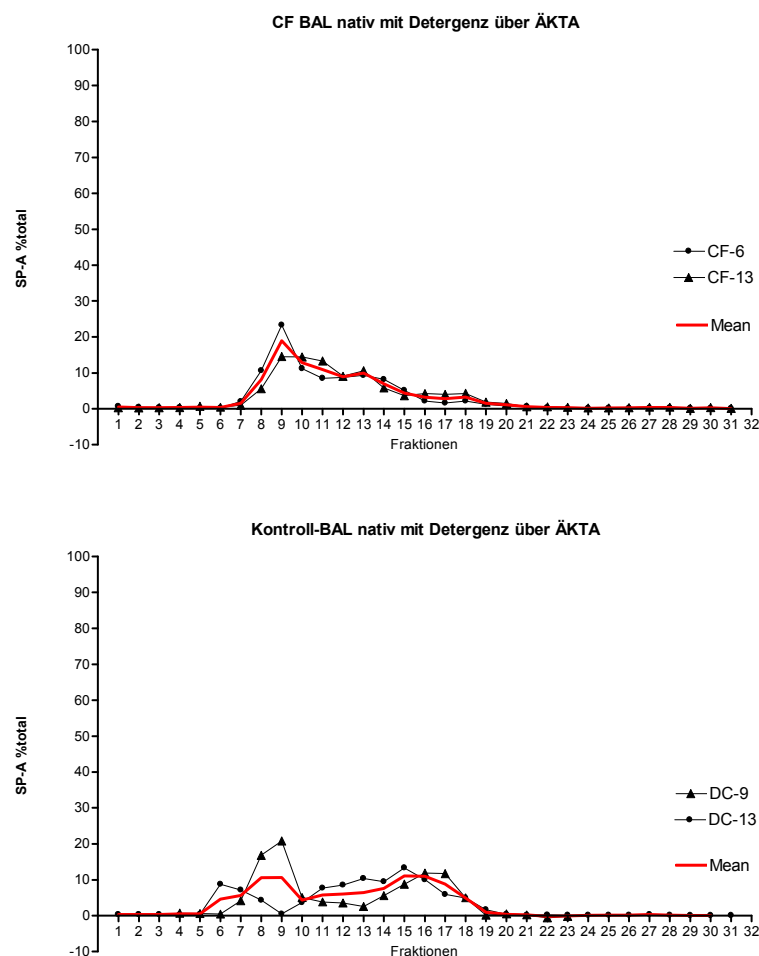


Abb. 6.12: Verteilung der SP-A oligomeren Formen der nativen BAL von CF und Kontrollen, zuvor wurde Detergenz (Triton X 100 0,1 %) zur Lavage hinzugefügt.

Oben: CF-BAL

Unten: Kontroll-BAL

6.2.3 Affinitätschromatographie ohne Detergenz:

Auswertung mittels 1 D Gelelektrophorese

Zur Vervollständigung der Versuche wurden nach Durchführung der Affinitätschromatographie mit Fucose ohne Detergenz, die einzelnen Eluate in der 1 D Gelelektrophorese unter denaturierten und reduzierten Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde die Lavage eines Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose (PAP) benutzt. Hierzu wurden 100 µl BAL (SP-A Gehalt betrug 1380 ng) auf die Fucose-Säule geladen und die Affinitätschromatographie wurde nach gewohntem Schema durchgeführt: allerdings ohne Detergenz in den Elutionspuffern.

Von derselben PAP Lavage wurde die Affinitätschromatographie mit Detergenz durchgeführt. Die Immunoblots der Versuche ohne Detergenz (Bild A) und mit Detergenz (Bild B) wurden miteinander in Abb. 6.13 verglichen.

Mit bloßem Auge ist erkennbar, dass beim Immunoblot nach Affinitätschromatographie ohne Detergenz (Bild A) in der 1. EDTA-wash Fraktion die stärksten Banden zu sehen sind. Allerdings sieht man in der Flow-through und den Calcium-wash Fraktionen auch relativ gleichmäßig starke Banden (entsprechen dem „SP-A non-binding“). Insgesamt lassen sich viele Banden im niedrigen und höheren kDa Bereich darstellen.

Beim Immunoblot mit Detergenz (Bild B) ist ebenfalls erkennbar, dass die stärksten Banden in der 1. EDTA-wash Fraktion zu sehen sind. Der große Unterschied zum Immunoblot ohne Detergenz ist, dass hier insgesamt wenig Aufspreizung in Banden erkennbar ist und die stärksten Banden v.a. im 1. Calcium wash und 1. EDTA wash eluiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unabhängig vom Detergenz SP-A an Fucose in etwa gleicher Menge binden kann. Die Darstellung der oligomeren SP-A Formen ist bei den Versuchen mit Detergenz unterschiedlich: es lassen sich weniger Banden (im Bereich des niedrigen und höheren Molekulargewichts von SP-A) in der 1 D Gelelektrophorese darstellen.

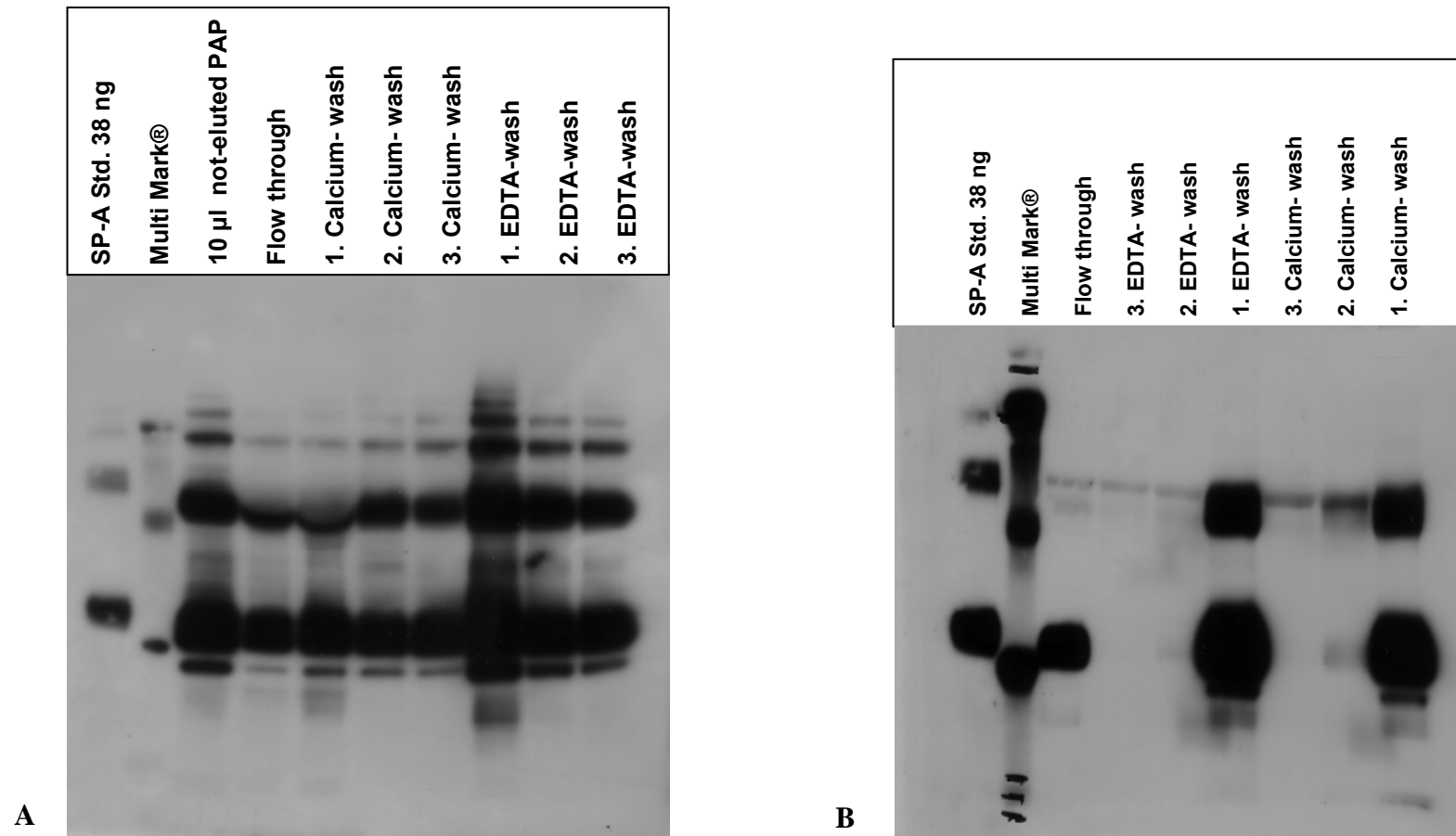


Abb. 6.13: Immunoblot von SP-A einer PAP-BAL nach Fucose-Affinitätschromatographie:

A: Affinitätschromatographie ohne Detergenz (SP-A Konzentration, die auf die Fucosesäule geladen wurde: 1380 ng)

B: Affinitätschromatographie mit Detergenz (SP-A Konzentration, die auf die Fucosesäule geladen wurde: 3000 ng)

Die Eluate werden mittels NuPAGE® 10% Bis-Tris, MOPs Puffer unter denaturierten und reduzierten Bedingungen analysiert. Als Standard wurden 38 ng humanes rh SP-A verwendet.

Literaturverzeichnis

- Ariki S, Nishitani C, Kuroki Y** "Diverse functions of pulmonary collectins in host defense of the lung." J Biomed Biotechnol. 2012;2012:532071
- Armstrong, D. S. et al.** "Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis." Am.J.Respir.Crit Care Med. 156.4 Pt 1 (1997): 1197-204.
- Armstrong, D. S. et al.** "Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening." Pediatr.Pulmonol. 40.6 (2005): 500-10.
- Blau, H. et al.** "Nitric oxide production by rat alveolar macrophages can be modulated in vitro by surfactant protein A." Am.J.Physiol 272.6 Pt 1 (1997): L1198-L1204.
- Borron, P. et al.** "Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor." Am.J.Physiol 275.4 Pt 1 (1998): L679-L686.
- Bradford, M. M.** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72 (1976): 248-54.
- Bufler, P. et al.** "Surfactant protein A and D differently regulate the immune response to nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* and its lipopolysaccharide." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 28.2 (2003): 249-56.
- Chander, A.** "Regulation of lung surfactant secretion by intracellular pH." Am J Physiol 257.6 Pt 1 (1989): L354-L360.
- Cheng G, Ueda T, Numao T et al.** Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma. Eur Respir J. 2000;16(5):831-835.
- Crouch E, Hartshorn K, Ofek I.** "Collectins and pulmonary innate immunity." Immunol Rev. 2000 Feb;173:52-65. Review.
- Crouch, E. and J. R. Wright.** "Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense." Annu.Rev.Physiol 63 (2001): 521-54.

- Crouch, E. C.** "Collectins and pulmonary host defense." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 19.2 (1998): 177-201.
- Dargaville, P. A., M. South, and P. N. McDougall.** "Surfactant abnormalities in infants with severe viral bronchiolitis." Arch.Dis.Child 75.2 (1996): 133-36.
- Donaldson, S. H. and R. C. Boucher.** "Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." Curr.Opin.Pulm.Med. 9.6 (2003): 486-91.
- Gardai, S. J. et al.** "By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation." Cell 115.1 (2003): 13-23.
- Gibson, R. L., J. L. Burns, and B. W. Ramsey.** "Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis." Am.J.Respir.Crit Care Med. 168.8 (2003): 918-51.
- Griese, M.** "Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art 77." Eur.Respir.J 13.6 (1999): 1455-76.
- Griese, M., P. Birrer, and A. Demirsoy.** "Pulmonary surfactant in cystic fibrosis." Eur Respir J 10.9 (1997): 1983-8.
- Griese M, von Bredow C, Birrer P.** Reduced proteolysis of surfactant protein A and changes of the bronchoalveolar lavage fluid proteome by inhaled alpha 1-protease inhibitor in cystic fibrosis. Electrophoresis. 2001;22(1):165-171.
- Griese, M., L. I. Gobran, and S. A. Rooney.** "Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues." Am J Physiol 261.6 Pt 1 (1991): 434-42.
- Griese M, Maderlechner N, Ahrens P, Kitz R.** "Surfactant proteins A and D in children with pulmonary disease due to gastroesophageal reflux." Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jun 1;165(11):1546-50.
- Gunther, A. et al.** "Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema." Am J Respir Crit Care Med 153.1 (1996): 176-84.

- Haagsman, H. P.** "Interactions of surfactant protein A with pathogens." Biochim.Biophys.Acta 1408.2-3 (1998): 264-77.
- Haagsman, H. P. and R. V. Diemel.** "Surfactant-associated proteins: functions and structural variation." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 129.1 (2001): 91-108.
- Haagsman, H. P. et al.** "The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein." J.Biol.Chem. 262.29 (1987): 13877-80.
- Haagsman, H. P. et al.** "Surfactant collectins and innate immunity." Neonatology. 93.4 (2008): 288-94.
- Haagsman, H. P. and L. M. van Golde.** "Synthesis and assembly of lung surfactant." Annu.Rev.Physiol 53 (1991): 441-64.
- Haddad, I. Y. et al.** "Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A." Am.J.Physiol 267.3 Pt 1 (1994): L242-L249.
- Hawgood, S. et al.** "Chemical characterization of lung surfactant apoproteins: amino acid composition, N-terminal sequence and enzymic digestion." Biochem.Soc.Trans. 13.6 (1985): 1092-96.
- Heinrich SM, Griese M.** Assessment of surfactant protein A (SP-A) dependent agglutination. BMC Pulm Med. 2010 Nov 22;10:59.
- Hickling, T. P., R. Malhotra, and R. B. Sim.** "Human lung surfactant protein A exists in several different oligomeric states: oligomer size distribution varies between patient groups." Mol.Med. 4.4 (1998): 266-75.
- Holm, B. A. et al.** "Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases." J.Appl.Physiol 71.1 (1991): 317-21.
- Holmskov, U., S. Thiel, and J. C. Jensenius.** "Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense." Annu.Rev.Immunol. 21 (2003): 547-78.
- Holmskov, U., S. Thiel, and J. C. Jensenius.** "Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense." Annu.Rev.Immunol. 21 (2003): 547-78.

- Hoover, R. R. and J. Floros.** "Organization of the human SP-A and SP-D loci at 10q22-q23. Physical and radiation hybrid mapping reveal gene order and orientation." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 18.3 (1998): 353-62.
- Hull, J. et al.** "Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis." Am.J.Respir.Crit Care Med. 156.1 (1997): 161-65.
- Jobe, A. H.** "Pulmonary surfactant therapy." N.Engl.J.Med. 328.12 (1993): 861-68.
- Katyal, S. L., G. Singh, and J. Locker.** "Characterization of a second human pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 6.4 (1992): 446-52.
- Kishore, U. et al.** "Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors." Mol.Immunol. 43.9 (2006): 1293-315.
- Kishor U, Madan T, Sarma PU, Singh M, Urban BC, Reid KB.** Protective roles of pulmonary surfactant proteins, **SP-A** and SP-D, against lung allergy and infection caused by *Aspergillus fumigatus*.Immunobiology. 2002 Sep;205(4-5):610-8. Review.
- Konstan, M. W. et al.** "Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation." Am.J.Respir.Crit Care Med. 150.2 (1994): 448-54.
- LeVine, A. M. et al.** "Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection." J.Immunol. 158.9 (1997): 4336-40.
- Madan, T. et al.** "Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages." Infect.Immun. 65.8 (1997): 3171-79.
- Madan, T. et al.** "Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by *Aspergillus fumigatus* antigens and allergens." J.Clin.Invest 107.4 (2001): 467-75.
- Malhotra, R. et al.** "Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A)." Biosci.Rep. 13.2 (1993): 79-90.

- Mason, R. J., K. Greene, and D. R. Voelker.** "Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease." Am J Physiol 275.1 Pt 1 (1998): 1-13.
- McCormack, F. X.** "Structure, processing and properties of surfactant protein A." Biochim.Biophys.Acta 1408.2-3 (1998): 109-31.
- Meyer, K. C. et al.** "Function and composition of pulmonary surfactant and surfactant-derived fatty acid profiles are altered in young adults with cystic fibrosis." Chest 118.1 (2000): 164-74.
- Noah, T. L. et al.** "Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med 168.6 (2003): 685-91.
- Oberley RE, Snyder JM.** "Recombinant human SP-A1 and SP-A2 proteins have different carbohydrate-binding characteristics." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 May;284(5):L871-81. Epub 2002 Dec 27.
- Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, Shih MJ, Dodds AW, Reid KB.** Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin.J Biol Chem. 2004 Jul 30;279(31):32728-36.
- Ratjen F, Rehn B, Costabel U, Bruch J.** "Age-dependency of surfactant phospholipids and surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid of children without bronchopulmonary disease." Eur Respir J. 1996 Feb;9(2):328-33. Review.
- Ratjen, F. et al.** "DNA concentrations in BAL fluid of cystic fibrosis patients with early lung disease: influence of treatment with dornase alpha." Pediatr.Pulmonol. 39.1 (2005): 1-4.
- Ruano ML, Miguel E, Perez-Gil J, Casals C.** "Comparison of lipid aggregation and self-aggregation activities of pulmonary surfactant-associated protein A." Biochem J. 1996 Jan 15;313 (Pt 2):683-9.
- Ryan, S. F., Y. Ghassibi, and D. F. Liau.** "Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant in vitro." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 4.1 (1991): 33-41.

- Stahlman, M. T. et al.** "Immunolocalization of surfactant protein-D (SP-D) in human fetal, newborn, and adult tissues." J.Histochem.Cytochem. 50.5 (2002): 651-60.
- Stuart, G. R., R. B. Sim, and R. Malhotra.** "Characterization of radioiodinated lung surfactant protein A (SP-A) and the effects of oxidation on SP-A quaternary structure and activity." Exp.Lung Res. 22.4 (1996): 467-87.
- Strong, P. et al.** "A novel method of purifying lung surfactant proteins A and D from the lung lavage of alveolar proteinosis patients and from pooled amniotic fluid." J Immunol.Meth. 220 (1998): 139-49.
- von Bredow C, Birrer P, Griese M.** "Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis." Eur Respir J. 2001 Apr;17(4):716-22.
- Voss, T. et al.** "Structural comparison of recombinant pulmonary surfactant protein SP-A derived from two human coding sequences: implications for the chain composition of natural human SP-A." Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 4.1 (1991): 88-94.
- Wang, J. Y. et al.** "Interaction of human lung surfactant proteins A and D with mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens." Clin.Exp.Immunol. 106.2 (1996): 367-73.
- Weis, W. I. and K. Drickamer.** "Structural basis of lectin-carbohydrate recognition." Annu.Rev.Biochem. 65 (1996): 441-73.
- Wright, J. R.** "Immunomodulatory functions of surfactant." Physiol Rev. 77.4 (1997): 931-62.
- Wright, J. R.** "Immunoregulatory functions of surfactant proteins." Nat.Rev.Immunol. 5.1 (2005): 58-68.
- Wright, J. R.** "The "wisdom" of lung surfactant: balancing host defense and surface tension-reducing functions." Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 291.5 (2006): L847-L850.
- Wright, J. R.** "The "wisdom" of lung surfactant: balancing host defense and surface tension-reducing functions." Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 291.5 (2006): L847-L850.

8. Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Matthias Griesse ganz herzlich für die sehr engagierte und gute Betreuung meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Labor der pädiatrischen Pneumologie bedanken. Mein besonderer Dank gilt Andrea Schams, die mir mit großer Geduld die Grundlagen der Laborarbeit erklärt hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich möchte mich auch bei Steffi Gruschka für ihre Hilfe und die vielen netten gemeinsamen Stunden im Labor bedanken.

Auch meinen Mitdoktoranden Eva Bieleki, Steffi Heinrich, Asli Pamir, Christian Paschen, Jan Ripper, Christiane Sparr, Oliver Tafel möchte ich für viele hilfreiche Tipps während der Laborzeit danken.

Schließlich danke ich meinem Mann Christian, der mich stets motiviert und unterstützt hat und so auch zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.